SYNTHESE VON POLY(N^{ε}-TRIMETHYL-L-LYSIN) UND DESSEN KONFORMATION IN ABHÄNGIGKEIT VOM MILIEU

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde

eingereicht beim
Fachbereich Physikalische Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

YOUNG-HA K I M
aus Seoul, Korea

Marburg/Lahn 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

SYNTHESE VON POLY(N^{ε}-TRIMETHYL-L-LYSIN) UND DESSEN KONFORMATION IN ABHÄNGIGKEIT VOM MILIEU

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde

eingereicht beim
Fachbereich Physikalische Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

YOUNG-HA K I M
aus Seoul, Korea

Marburg/Lahn 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Physikalische Chemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am	29.6.1978
Tag der mündlichen Prüfung	18.8.1978
Berichterstatter:	Prof.Dr. G. Ebert
Mitberichterstatter:	Prof.Dr. W. Heitz

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1975 bis 1978 am Institut für Polymere im Fachbereich Physikalische Chemie der Philipps-Universität Marburg/Lahn durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof.Dr.G.Ebert, danke ich herzlich für die stete und wohlwollende Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof.Dr.W.Heitz danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst danke ich für die Gewährung eines Stipendiums, das es mir ermöglichte, meine Doktorarbeit in Deutschland durchzuführen.

Dem "Korea Institute of Science and Technology" möchte ich für die Anregung und die Unterstützung danken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0040

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung 1

2. Darstellung der Substanzen 5

2.1. Darstellung des N^{ε}-Carbobenzoxy-L-lysin-N^{α}-carboxyanhydrids 5

2.2. Polymerisation zu Poly-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysin 6

2.3. Darstellung des Poly-L-lysins, Abspaltung der Carbobenzoxy-Schutzgruppen 8

3. Untersuchung der Lysinoalaninbildung an Poly-L-lysin und dessen Spaltung durch Methylierung 10

3.1. Lysinoalaninbildung an Poly-L-lysin 10

3.2. Lysinoalaninspaltung durch Methylierung 14

4. Untersuchung der direkten Methylierung an Poly-L-lysin 20

5. Herstellung des Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysins und Untersuchung der Konformation mit Hilfe des Circular Dichroismuses und der Optischen Rotations-Dispersion 22

5.1. Herstellung des Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysins durch Methylierung von Poly-L-lysin 22

5.2. Untersuchung der Konformation mittels Circular Dichroismuses und Optischen Rotations-Dispersion 22

5.2.1. Konformation des Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysins in Wasser 23

5.2.2. Konformation in Elektrolyt-Lösungen 27

5.2.2.1. in Perchlorat-Lösungen 27

5.2.2.2. in Sulfat- und Natriummethylsulfat-Lösungen 39

5.2.2.3. in Rhodanide-Lösungen 43

5.2.2.4. in Chlorid-, Bromid- und Jodid-Lösungen 46

5.2.3. Konformation in Tensid-Lösungen 48

5.2.4. Konformation in alkoholischen Lösungen 52

6. Zusammenfassung 55

7. Experimenteller Teil 58

7.1. Trocknung der verwendeten Lösungsmittel 58

7.2. Methodik 59

7.2.1. Durchführung der Aminosäureanalysen 59

7.2.2. Viskosimetrische Messungen 62

7.2.3. CD- und ORD-Messungen 63

7.2.4. IR-, UV- und NMR-Spektren 66

7.3. Untersuchung der Lysinoalaninbildung an Poly-L-lysin mit Hilfe des pH-Staten 66

7.4. Untersuchung der Lysinoalaninspaltung an Copoly-L-lysinoalanin-lysin durch Methylierung 67

7.5. Untersuchung der direkten Mrthylierung an Poly-L-lysin 68

7.6. Herstellung des Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysins durch Methylierung von Poly-L-lysin 68

7.7. Darstellung des Poly-L-lysins 69

7.7.1. N^{ε}-Carbobenzoxy-L-lysin 69

7.7.2. N^{ε}-Carbobenzoxy-L-lysin-N^{α}-carboxyanhydrid 69

7.7.3. Natriummethylat-Initiator 71

7.7.4. Poly-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysin 72

7.7.5. Poly-L-lysin 72

7.8. N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester (2-Acetaminoacrylsäuremethylester) 74

7.9. Lysinoalanin, N^{ε}-(2-Amino-2-carboxyäthyl)-L-lysin 75

7.10. N^{ε}-Dimethyllysin 77

7.11. N^{ε}-Trimethyllysin 78

7.12. Synthese von N^{ε}-Methyl-N^{ε}-(2-Amino-2-carboxyäthyl)-L-lysin (N^{ε}-Methyllysinoalanin) 79

8. Literaturverzeichnis 81

Verzeichnis der Abkürzungen

Cbo	Carbobenzoxy-(Benzyloxycarbonyl-)
CD	Circular Dichroismus
Copoly-L-Lys-LAL	Copoly-L-lysin-lysinoalanin
Dioxan	1.4-Dioxan
DK	Dielektrizitätskonstante
DMF	N,N-Dimethylformamid
DML	N^{ε}-Dimethyllysin
LAL	Lysinoalanin, N^{ε}-(2-Amino-2-carboxyäthyl)-L-lysin
Lys	L-lysin
MML	N^{ε}-Methyllysin
NCA	N^{α}-Carboxyanhydrid
N^{ε}-cbo-L-lysin	N^{ε}-Carbobenzoxy-L-lysin
NDS	Natriumdodecylsulfat
NOS	Natriumoctylsulfat
ORD	Optische Rotations-Dispersion
PCBL	Poly-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysin
PLGS	Poly-L-glutaminsäure
PLHA	Poly-L-homoarginin
PLL	Poly-L-lysin
PLO	Poly-L-ornithin
PTMLL	Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysin
THF	Tetrahydrofuran
TML	N^{ε}-Trimethyllysin

1. Einleitung und Problemstellung

Proteine und Polypeptide können formal als Polyamide des 2-Nylontyps mit dem Strukturelement (-NH-CHR-CO-) beschrieben werden. Die stark polaren Carbonamidgruppen führen durch die Ausbildung von intra- oder interchenarer Wasserstoffbrückenbindungen zu geordneten Strukturen wie z.B. der α-Helix und der β-Faltblattstrukturen. Diese sog. Sekundärstrukturen können ihrerseits wiederum in bestimmter Weise räumlich angeordnet sein, so daß sie z.B. in den fibrillären oder globulären Proteinen auftreten (Tertiärstruktur).
Bei der Zusammenlagerung mehrerer solcher Molekülketten entstehen Einheiten höherer Ordung, die Quartärstruktur.
Diese Konformationen, die von der Aminosäurenzusammensetzung und -sequenz (Primärstruktur) bestimmt werden, sind verantwortlich für die verschiedenen biologischen Wirkungen der Proteinen.
Wie FASMAN und BLOUT (1) an homopolymeren Poly-α-Aminosäuren gezeigt haben, werden diese Konformationen durch die Art der Seitenketten R wesentlich bestimmt, wobei die etwa 20 verschiedenen Reste nicht nur einen unterschiedlichen Raumbedarf haben, sondern auch verschiedenartige zwischenmolekulare Wechselwirkungen eingehen können. Unter solchen Wechselwirkungen verstehen wir Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrückenbindungen, polare bzw. hydrophobe Wechselwirkungen.
Homopolymere Poly-α-Aminosäuren, die durch Polymerisation von N^{α}-Carboxyanhydriden darstellbar sind, tragen einheitliche Seitenketten, so daß sie als Modellsubstanz von Proteinen und Polypeptiden für die Untersuchung solcher Wechselwirkungen geeignet wind.

In vielen Arbeiten wie die von G.EBERT et al. (2,3,4) u.a. wurde gezeigt, daß die Stabilität und Art solcher Konformationen durch die Änderung äußerer Parameter wie z.B. der Temperatur bzw. des pH-Wertes des Sytems, oder der Art und der Konzentration an Elektrolyten stark beeinflußt wird.

Außer den 20 Aminosäuren, aus denen natürliche Proteine und Polypeptide im wesentlichen bestehen, gibt es einige Aminosäuren, die nur selten in der Natur vorkommen oder durch artefizielle Behandlungen von natürlichen Proteinen erhalten werden. Eine davon ist Lysinoalanin(LAL). LAL wurde sowohl nach alkalischer Behandlung (5) als auch beim Erhitzen (6) von natürlichen Proteinen gefunden, jedoch kommt es auch in der Natur vor (7). Über seine Stoffwechselwirkung (8) und biologischen Effekte (9) wurde in der letzten Zeit viel diskutiert. Bekanntlich entsteht LAL durch Anlagerung der ε-Aminogruppe des Lysins an die Doppelbindung des Dehydroalanins, das durch alkalische bzw. thermische Abspaltung von Cystin- und Serin-Resten über eine β-Eliminierung entsteht (5,6). In der Arbeit von Ch.EBERT (10a) wurde gezeigt, daß LAL-Reste nicht nur in alkalisch behandelter Wolle sondern auch bei der Methylierung mit CH_3J entstehen. Dabei werden dimethylierte Cystein-Reste $(CH_3)_2S^+-CH_2-CH<$ durch eine β-Eliminierung unter LAL-Bildung abgespalten. Es wurde gefunden, daß dabei auch N^{ε}-methyliertes Lysin entsteht, wobei der Methylierungsgrad der Produkte von den Reaktionsbedingungen wie Temperatur und pH-Wert abhängig ist. N^{ε}-methylierte Lysine, die hier ebenfalls als artefizielle Aminosäuren auftreten, kommen aber auch in der Natur vor — N^{ε}-Methyllysin (11), N^{ε}-Dimethyllysin (12) und

N^{ε}-Trimethyllysin (13,14) wurden durch Aminosäureanalysen von bestimmten natürlichen Proteinen identifiziert, insbesondere von Histonen.

Aus den Arbeiten von EBERT (2,3,4) über die Wirkungen der Anionen auf die Konformation der basischen Poly-α-Aminosäuren ergaben sich folgende Ergebnisse; Die α-Helix basischer Poly-α-Aminosäuren wird durch Perchlorationen stabilisiert. Dies ist offensichtlich ein elektrostatischer Abschirmeffekt gegenüber den positiv geladenen Seitengruppen unterhalb etwa pH 11, wobei die Perchlorationen um die rechtsgängige α-Helix des Poly-α-Aminosäurekettengerüstes eine linksgängige Superhelix aufgebaut haben. Diese Superhelix kann auch als ein Polypeptide-Ion-Komplex angesehen werden, der z.B. durch Sedimentationsgeschwindigkeitsbestimmung nachgewiesen werden kann (15). Dagegen zeigen die basischen Poly-α-Aminosäuren in Sulfatlösungen infolge einer negativen Überschußladung pro Rest keine α-Helix, sondern anscheinend eine gestreckte Konformation. Das nur einwertig negative Natriummethylsulfat stabilisiert hingegen in höheren Konzentrationen die α-Helix von Poly-L-lysin (3,4). Bei der Bildung solcher α-helicalen Komplexe aus basischen Poly-α-Aminosäuren und Anionen sind u.a. folgende drei Faktoren von Bedeutung; die Änderung der Wasserstruktur in der Umgebung von Anionen und Polykation, die spezifische Adsorption der Anionen durch das Polymer und die dadurch bedingte gegenseitige elektrostatische Abschirmung der positiv geladenen, sich abstoßenden Seitenketten.

Um diese Wechselwirkungen besser zu verstehen und zu erklären, ist es günstig, durch N-Methylierung oder N-Acetylierung die basischen Seitenketten zu modifizieren. Durch die Modifizierung werden ja die Wechselwirkungen der Seitenketten mit den Ionen stark beeinflußt. Die dadurch hervorgerufenen Auswirkungen etwa auf die Konformationstabilität können gemessen und verglichen werden.
Solche Modifizierungen sind auch deswegen interessant, da sie in vivo an bestimmten basischen Aminosäureresten natürlicher Proteine stets der Mitose vorausgehen und somit für die Replication notwendige Konformationänderungen der Nucleoproteine bedingen sollen.

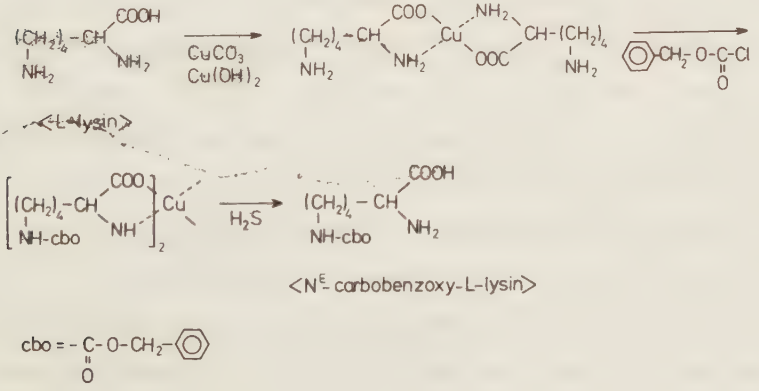
Die Aufgabe dieser Arbeit ist

1) Die Einführung von N^{ε}-Methylgruppen an NH_2-Seitenketten des Poly-L-lysins.
   Dies geschieht durch zwei mögliche Prozesse;
   a) durch die Anlagerung von Dehydroalaninderivat an Poly-L-lysin unter Lysinoalaninbildung und anschließender Methylierung unter Wiederspaltung des Dehydroalaninderivats.
   b) durch direkte Methylierung an Poly-L-lysin
2) Die Untersuchung der Konformation von N^{ε}-methylierten Poly-L-lysinen unter verschiedenen Bedingungen und ihrer Wechselwirkungen mit Anionen

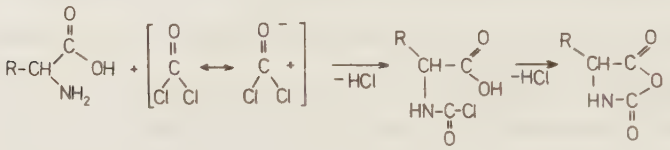
2. Darstellung der Substanzen

2.1. Darstellung des N^{ε}-Carbobenzoxy-L-lysin-N^{α}-Carboxyanhydrids

Die N^{α}-Carboxyanhydride (NCAś, LEUCHSśche Anhydride) der α-Aminosäuren ermöglichen als aktivierte Monomere die Synthese hochmolekularer Polypeptide. Bei diesem Prozess müssen aktive Seitenketten der Aminosäuren vorher blockiert werden. Für die Blockierung einer Aminogruppe gibt es verschiedene Möglichkeiten(16); in Form eines Acyl-Derivates, eines Alkyl-Derivates oder als Schiffsche Base. Die wichtigste Gruppe, die der Acyl-Derivate, kann in die Typen Carbonsäureamide, Urethane und Säurenamide substituierter anorganischer Säuren unterteilt werden. Die Einführung des Carbobenzoxy-Restes(17) - die erste universell anwendbare Amino-Schutzgruppe - ergibt eine Urethan-Gruppierung. Hier wurde die ε-Aminogruppe des L-lysins von einer Carbobenzoxygruppe geschützt. Die Umsetzung verläuft nach folgendem Reaktionsschema(18);



Das von LEUCHS(19) entwickelte Syntheseverfahren von NCAś wurde von FUCHS-FARTHING(20,21) verbessert, indem Aminosäuren einstufig in org. Lösungsmittel mit Phosgen umgesetzt wurden. Das erhaltene N^{ε}-Carbobenzoxy-L-lysin wurde auch hier mit Phosgen in THF umgesetzt.



R = cbo-NH-$(CH_2)_4$-
für N^{ε}-cbo-L-lysin

<N-Carboxyanhydrid>
(Oxazolidin-2.5-dion)

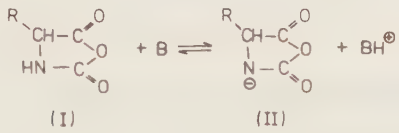
NCAś sind außerordentlich reaktiv; die Gegenwart von Wasser, Alkoholen und verschiedenen Basen auch in geringer Konzentration bei mäßigen Temperaturen führen zur Polymerisation unter CO_2-Abspaltung.

2.2. Polymerisation zu Poly-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysin

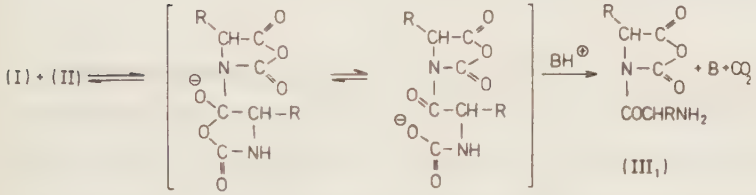
Die Polymerisation von NCAś können je nach gewünschtem Polymerisationsgrad verschieden durchgeführt werden, z.B. thermisch ohne Initiator oder mit Initiatoren - durch starke Basen wie Natriumalkoholat und tertiäre Amine oder primäre und sekundäre Amine, oder durch andere schwache Basen wie Alkohole, Ammoniak und Wasser usw.. Die bei der thermischen Polymerisation erhaltenen Molekulargewichte sind im allgemeinen größer als die durch Zusatz von Initiatoren erhaltenen. Bei gleichen Monomer/Initiator Verhältnissen sind die Molekulargewichte im Falle der starken Basen und tertiären Aminen wesentlich höher als bei den primären und sekundären Aminen und den anderen

schwachen Basen. Der Polymerisationsmechanismus mit starken Basen bzw. tertiären Aminen ist von dem mit primären und sekundären Aminen verschieden(22,23), und verläuft nach BAMFORD et al.(24,25) wie folgt;

Initierung

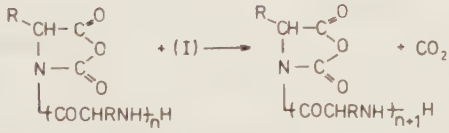


(I) (II)



(III$_1$)

Wachstum:

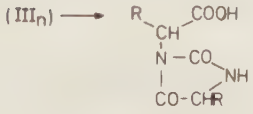


(III$_n$) (III$_{n+1}$)

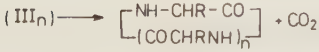
$(III_n) + (III_m) \longrightarrow (III_{n+m}) + CO_2$

$(III_n) + (II) + BH^{\oplus} \longrightarrow (III_{n+1}) + CO_2 + B$

Abbruch



<substituierte Hydantoin-3-essigsäure>



<cyclische Peptide>

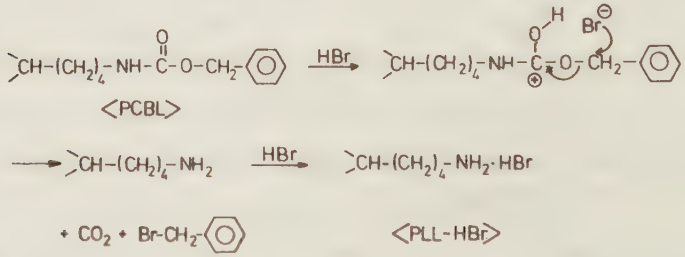
B = NR'_3 , NaOR'

R = $-(CH_2)_4-$ NH-cbo für N^{ε}- cbo-L-lysin

Nach diesem Reaktionsmechanismus läßt sich erklären, daß der erhaltende Polymerisationsgrad höher als $(M)_o/(I)_o$ wird. Hier wurde N^{ε}-cbo-L-lysin-NCA in absoluten Dioxan mit dem Initiator $NaOCH_3$ im Verhältnis $(M)_o/(I)_o = 200$ polymerisiert(26). Das viskosimetrisch bestimmte Molekulargewicht betrug 256000 (s. Exp.).

2.3. Darstellung des Poly-L-lysins, Abspaltung der Carbobenzoxy-Schutzgruppen

Die Carbobenzoxy-Schutzgruppe kann in verschiedenen Weise wieder abgespalten werden; im allgemeinen durch katalytische Hydrierung mit Pd, Acidolyse mit HBr und Reduktion mit NH_3/Na. Durch Hydrierung mit Pd-Katalysator kann die Cbo-Gruppe unter sehr milder Bedingung abgespalten werden, aber nicht effektiv genug bei hochmolekularen Polymeren (27). Bei dem Reduktionsverfahren ist es nicht so leicht, die Produkte zu isolieren und zu reinigen(28). Acidolyse mit HBr ist eine quantitative Methode, und seit der Entwickelung von BEN-ISHAI(29) hat sie zu den Erfolgen der Proteinchemie in hohem Maße beigetragen. Die Abspaltung durch Acidolyse läuft nach folgendem Schema;

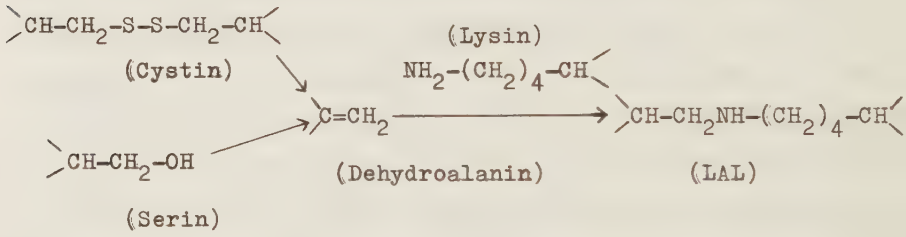


Da die freiwerdende Aminogruppe ebenfalls ein Äquivalent Säure zur Bildung des Ammoniumsalzes verbraucht, werden mindestens 2 Äquivalente Säure benötigt. Das intermediär auftrende Benzylkation und das aus diesem gebildete Benzylbromid können zu Nebenreaktionen führen. Als Lösungsmittel können neben der ursprünglichen Essigsäure(29) auch organische Lösungsmittel(26) verwendet werden, so daß das erhaltene PCBL-Polymerisat in Dioxan direkt oder nach Verdünnung mit $CHCl_3$ zur Abspaltung eingesetzt werden kann, ohne vorher isoliert zu werden. Die Reaktion muß unter Ausschluß von Feuchtigkeit und freiem Brom durchgeführt werden, sonst treten Nebenreaktionen wie Hauptkettenabspaltung (Molekulargewichtserniedrigung) auf. Freies Brom läßt sich später vom Produkt nicht abtrennen und verursacht die Gelbfärbung des Produktes. Hier wurde freies Brom dadurch entfernt, daß HBr-Gas durch eine Tetralin-Waschflasche geleitet wurde. Die Reaktionsführung bei hoher Temperatur führt auch zur Hauptkettenabspaltung. Hier wurde ein modifiziertes HCl/HBr-Verfahren von FASMAN et al. (26) angewendet, wobei vor der HBr-Einleitung trockenes HCl-Gas in die Reaktionslösung eingeleitet wurde, damit weniger gelbliches PLL·HBr erhalten wurde. Erhaltenes PLL·HBr wurde durch Dialyse gegen verdünnte HCl-Lösung zu PLL·HCl umgesetzt. Dieses PLL·HCl zeigte keine Absorption bei 260-260 mμ, was bedeutet, daß alle cbo-Gruppen vollständig abgespalten wurden. Das viskosimetrisch bestimmte Molekulargewicht des PLL·HCl betrug 118000(s. Exp.).

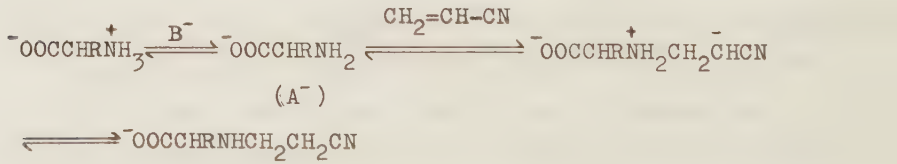
3. Untersuchung der Lysinoalaninbildung an Poly-L-lysin und seine Spaltung durch Methylierung

3.1. Lysinoalaninbildung an Poly-L-lysin

Lysinoalanin(LAL) entsteht bekanntlich durch Anlagerung der ε-Aminogruppe des Lysins an die Doppelbindung des Dehydroalanins, das aus Cystin- und Serinresten durch Methylierung oder alkalische bzw. thermische Behandlung der Proteine über eine β-Eliminierung entsteht(5,6,10a).

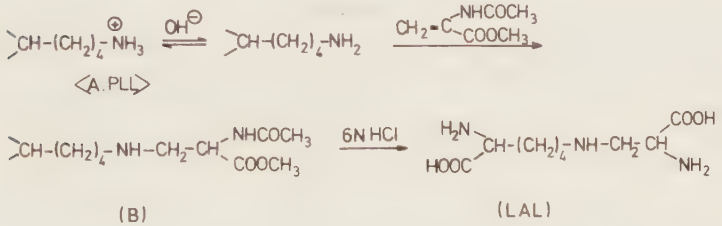


Über den Mechanismus und Kinetik der Anlagerung wurde von FRIEDMAN et al. (30) ausführlich diskutiert, indem Acrylonitril an Aminogruppen verschiedener Aminosäurereste angelagert wurde;



Da die nucleophile MICHAEL-Addition des Aminosäureanions(A^-) an die Doppelbindung des Acrylonitrils die geschwindigkeitsbestimmende Stufe der Reaktion darstellt, hängt der Reaktionsverlauf vom pH-Wert des Systems ab.

Hier wurde N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester an Poly-L-lysin bei verschiedenen Reaktionbedingungen (Temperatur, pH-Wert und Mol-verhältnisse der Reaktanden) angelagert.



Da sich der pH-Wert des Systems während der Reaktion ändert, wurde hier ein pH-Stat(s. Exp.) benutzt, um die Reaktion bei konstantem pH-Wert durchzuführen. Allerdings wurde diese Methode nicht der Kinetik wegen durchgeführt, sondern um eine maximale Ausbeute an LAL-resten zu erhalten. Da die Funktionsfähigkeit der Glaselektroden des pH-Meters in der Reaktionslösung begrenzt ist, wurde als Reaktionszeit für alle Umsetzungen 8 Stunden gewählt. Anschließend wurde durch Aminosäureanalyse die Ausbeute an LAL-resten bestimmt. LAL und Lysin konnten über einer 29 cm hohen Säule mit Bio Rad A5-Harz (Verf. Nr. 1) gut getrennt werden, wie man in Abb. 1 sieht. Standard LAL wurde nach der Methode von OKUDA und ZAHN (31) synthetisiert und zur Aminosäureanalyse verwendet.
Um die günstigste Reaktionsbedingung für die LAL-bildung zu ermitteln, wurde die Reaktion bei 20°C in verschiedenen pH-Bereichen durchgeführt. Die aus der Aminosäureanalyse ausgewertete Ergebnisse wurden in Tab. 1 zusammengestellt.

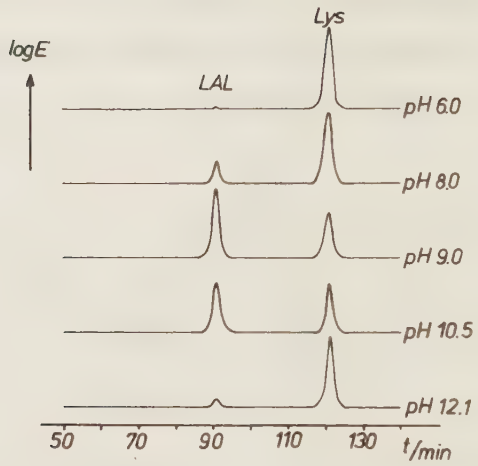


Abb. 1. Aminosäurechromatogramme von den Reaktiongemischen aus PLL(0.10 mM) und N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester(0.11 mM) bei 20°C (Aminosäureanalyseverfahren Nr. 1); Lys=Lysin, LAL=Lysinoalanin

Tab. 1. Ausbeute der gebildeten LAL-reste an Poly-L-lysin bei 20°C, mit PLL 0.10 mM und N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester 0.11 mM

pH-Wert	6.0	7.0	8.0	9.0	9.5	10.0	10.5	11.0	12.1
LAL (%)	0	2	6.3	28.7	36.9	32.7	30.1	18.2	2.3

Wie in der Tab. 1 zu sehen ist, zeigte die LAL-Ausbeute erwartungsgemäß bei pH 9.5 ein Maximum; bei niedrigen pH-Werten waren die ε-Aminogruppen der Lysinreste sicherlich nicht genug deprotoniert, um die Doppelbindungen der Dehydroalaninderivate in hohem Maß anzugreifen, und bei hohen pH-Bereichen werden Dehydroalaninderivate basisch schnell zersetzt, bevor sich Lysin angelagert hat.

Dann wurden Reaktionen bei pH 9.5 diesmal bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Wie Tab. 2 zeigt, war die LAL-Ausbeute bei 30°C und der gewählten Reaktionszeit (8 St.) am größten.

Tab. 2. Ausbeute der gebildeten LAL-reste an Poly-L-lysin bei pH 9.5, mit PLL 0.10 mM und N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester 0.11 mM

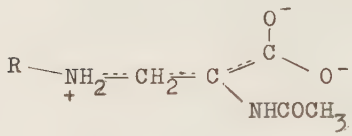
Temp. (°C)	20.0	30.0	40.0	50.0
LAL(%)	36.0	39.7	31.9	13.2

Die erhaltenen LAL-Ausbeuten in Tab. 1 und 2 waren niedriger als erwartet. Dies kann nur darauf zurückgeführt werden, daß der eingesetzte N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester unter den gegebenen Bedingungen nicht hinreichend so stabil war, sondern von Basen zersetzt wurde. Bei hohen pH-Werten und hohen Temperaturen wird diese Zersetzung zunehmend aufgetreten sein. Durch die Zugabe von überschüssigen Dehydroalaninderivat (zweifacher Überschuß) konnte die LAL-Ausbeute bis zu 66.8% erhöht werden. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den von FRIEDMAN et al. (32) überein; sie haben unter ähnlichen Bedingungen LAL-Ausbeute von etwa 50 % erhalten.

Reaktivität des N^{α}-Acetyldehydroalanins

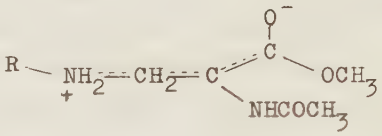
Erste Untersuchungen, die mit N^{α}-Acetyldehydroalanin durchgeführt wurden, zeigten, daß die ε-Aminogruppen des PLL nur in sehr geringer Menge an die Doppelbindungen dieser Verbindung angelagert wurden. Die Reaktivität des N^{α}-Acetyldehydroalanins ist gegenüber der des N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylesters sehr klein. Dies kann auf unterschiedliche

Übergangszustände zurückgeführt werden, wie inzwischen auch von FRIEDMAN et al. (32) nachgewiesen wurde. Der Übergangszustand von N^{α}-Acetyldehydroalanin(C) wird wegen der Abstoßung der negativen Ladung unstabiler als der von N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester (D).



(C)

Übergangszustand von N^{α}-Acetyldehydroalanin



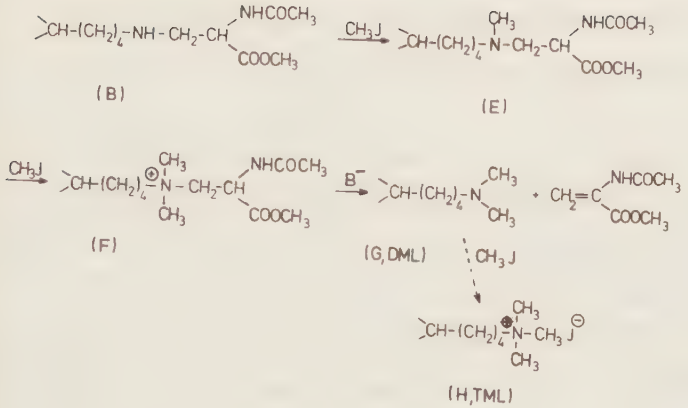
(D)

Übergangszustand von N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester

Aus diesem Grund wurden alle Untersuchungen mit N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester durchgeführt, der durch Veresterung des Silbersalzes des N^{α}-Acetyldehydroalanins mit CH_3J erhalten wurde (33).

3.2. Untersuchung der Lysinoalaninspaltung durch Methylierung

Es wurde von Ch. EBERT (10 b) gezeigt, daß Lysinoalaninreste in Keratinfasern durch Methylierung über eine β-Eliminierung gespalten wurden und N^{ε}-methylierte Lysine entstanden. Da der erste Reaktionschritt eine nucleophile Substitution des sekundären N-Atoms des LAL durch das C-Atom des Methyljodids ist und die Spaltung (β-Eliminierung) eine Folge der Dimethylierung ist, wird der Reaktionsverlauf wieder vom pH-Wert abhängig.



Dabei wird Dehydroalanin zurückgebildet und es entsteht N^{ε}-Dimethyllysin (DML), das bei geeigneten pH-Werten zum N^{ε}-Trimethyllysin (TML) weiter methyliert werden kann. N^{ε}-methylierte Lysine sind ebenfalls wie LAL nicht nur artefizielle Aminosäuren, sondern sie kommen auch in der Natur vor; N^{ε}-Methyllysin (MML, 11), DML (12) und TML (13,14) sind bei der Aminosäureanalyse von bestimmten natürlichen Proteinen (Histonen) identifiziert worden.

Hier wurde diese LAL-Spaltung durch Methylierung an Copoly-LAL-Lys verwendet, um N^{ε}-Methylgruppen an PLL einzuführen. Copoly-LAL-Lys (LAL-Reste 50-60 %) wurde nach der unter 3.1 beschriebenen Methode bei der zur LAL-bildung günstigsten Bedingung (bei 30°C, in pH 9.5) aus PLL und N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester erhalten. Für eine Untersuchung wurde 0.1 mM Copoly-LAL-Lys mit überschüssigem CH_3J versetzt, wobei die Reaktionen ebenfalls mit Hilfe des pH-Staten bei konstanten pH-Werten und Temperaturen 8 St. durchgeführt wurden. Nach der Reaktion wurden die entstandenen N^{ε}-methylierten Lysine durch die Aminosäureanalyse bestimmt.

Als Standard für die Aminosäureanalyse wurden synthetisch dargestellte Lysinderivate verwendet; MML (Nutrional Chem. Corp.) wurde direkt verwendet. DML konnte durch Methylierung von N^{α}-Acetyllysin mit CH_2O und H_2 im Autoklaven erhalten werden (34,35). Durch Methylierung von N^{α}-Acetyllysin mit Dimethylsulfat wurde TML erhalten (36). Nach Verfahren Nr. 1 bei der Aminosäureanalyse wurde MML von den anderen Aminosäuren gut getrennt, aber dagegen gelang es nicht, DML und TML voneinander zu trennen. Allerdings wurden nach dem von LANGE und HEMPEL (14) abgewandelten Verfahren Nr. 2 DML und TML vollständig aufgetrennt, wie man in Abb. 2 sieht. Im Aminosäurechromatogramm des bei niedrigen pH-Werten umgesetzten Reaktionsgemisches trat noch ein zusätzlicher Peak direkt vor dem LAL-Peak bei 86 Min. auf. Dieser unbekannte Peak, der allerdings im Aminosäurechromatogramm der bei hohem pH umgesetzten Reaktionslösung nicht auftrat, kann nach dem Reaktionschema nur das N^{ε}-monomethylierte LAL (E im Reaktionschema) sein.

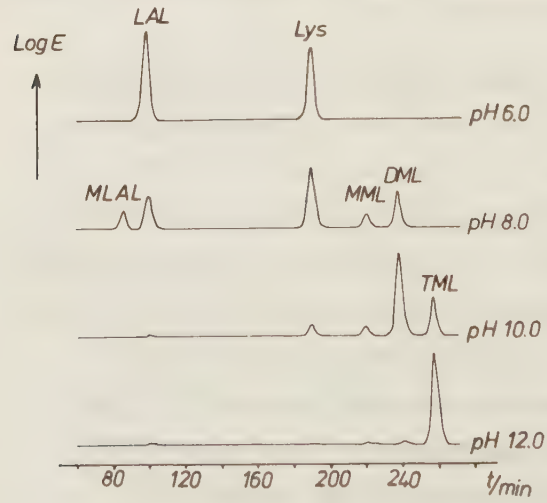
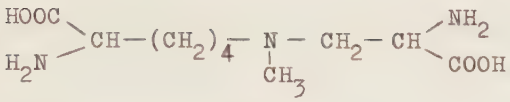


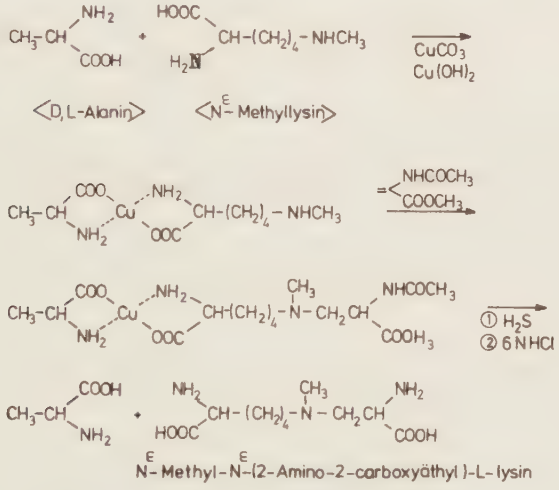
Abb. 2. Aminosäurechromatogramme von den Reaktiongemischen aus Copoly-LAL-Lys und CH_3J bei 20°C(Verfahren Nr.2)



N^{ε}-Methyllysinoalanin

N^{ε}-Methyl-N^{ε}-(2-Amino-2-carboxyäthyl)-L-lysin

Zur Identifizierung dieser noch unbekannten Aminosäure wurde N^{ε}-Methyl-N^{ε}-(2-Amino-2-carboxyäthyl)-L-lysin aus N^{ε}-Methyllysin und 2-Acetaminoacrylsäuremethylester in Analogie zur Lysinoalaninbildung von FINLEY und SNOW (37) nach folgendem Schema synthetisiert;



In dem ersten Schritt dieses Prozesses wurden die α-NH_2-Gruppen des N^{ε}-Methyllysins durch Bildung eines Cu-Komplexes mit einer äquimolaren Menge D.L-Alanin blockiert. Nach der Anlagerung der ε-$NHCH_3$-Gruppe des N^{ε}-Methyllysins an die Doppelbindung des 2-Acetaminoacrylsäureester wurde dieser Komplex wieder durch H_2S gespalten. Das erhaltene Gemisch aus D.L-Alanin und N^{ε}-Methyl-N^{ε}-(2-Amino-2-carboxyäthyl)-L-lysin wurde an einer Säule mit dem Harz Dowex 50 W-X8 (200-400 Mesh, 1.0 x 43 cm) abgetrennt. Dieses somit synthetisierte N^{ε}-Methyl-N^{ε}-(2-Amino-

-2-carboxyäthyl)-L-lysin zeigte im Aminosäurechromatogramm tatsächlich den Peak bei 86 Min.

Wie man aus den Ergebnissen in Tab. 3 erkennen kann, wurde DML bis in mäßig alkalischem pH-Bereich dominierend gebildet. Die maximale Ausbeute an DML wurde bei 20°C und pH 10, bei 30°C und pH 9 sowie bei 40°C und pH 8 erhalten. Oberhalb dieser pH-Bereiche wurde DML zu TML erwartungsmäßig weiter methyliert, so daß oberhalb pH 12 bei 20°C und pH 11 bei 30°C und 40°C ausschließlich TML erhalten wurde.

Tab. 3. Aminosäureanalyse der Reaktiongemische aus Copoly-L-LAL-Lys und CH_3J (Verfahren Nr.2)

	bei 20°C an Copoly-LAL(64.5)-Lys(35.5)						bei 30°C an Copoly-LAL(50.6)-Lys(49.4)						bei 40°C an Copoly-LAL(64.5)-Lys(35.5)					
pH	MLAL (%)	LAL (%)	Lys (%)	MML (%)	DML (%)	TML (%)	MLAL (%)	LAL (%)	Lys (%)	MML (%)	DML (%)	TML (%)	MLAL (%)	LAL (%)	Lys (%)	MML (%)	DML (%)	TML (%)
6	0	* 64.5 (100)	35.5 (100)	0	0	0	1.0	49.8 (98.5)	49.0 (99.0)	0.2	0	0	6.6	52.9 (82.0)	34.8 (98.0)	3.1	2.6	0
7	7.3	55.7 (86.4)	34.6 (97.5)	1.5	1.0	0	9.7	21.8 (43.1)	48.0 (97.1)	3.6	16.9	0	7.5	15.0 (23.3)	31.0 (87.3)	6.5	39.7	0.4
8	11.0	33.3 (51.7)	30.4 (84.6)	5.5	20.2	0	0.8	2.2 (4.3)	39.4 (79.7)	4.0	50.7	3.0	0	1.1 (1.8)	24.5 (69.0)	2.7	54.9	16.8
9	3.9	4.9 (7.6)	24.0 (67.6)	4.4	61.6	1.7	0	0.9 (1.8)	17.3 (35.1)	3.8	51.0	27.0	0	1.3 (2.0)	2.4 (6.8)	0	45.3	50.9
10	0	0.7 (1.2)	11.3 (31.8)	4.6	69.0	14.4	0	1.2 (2.3)	6.3 (12.8)	0.3	39.7	52.5	0	1.1 (1.8)	2.2 (6.2)	0	22.6	74.1
11	0	1.0 (1.4)	4.6 (13.0)	2.3	46.4	45.7	0	0.7 (1.3)	5.1 (10.3)	0	0.3	94.0	0	0.5 (0.8)	1.1 (3.1)	0	0	98.4
12	0	0.8 (1.2)	2.2 (6.2)	1.2	3.5	92.3	0	1.2 (2.3)	1.8 (3.6)	0	0	97.0	-	-	-	-	-	-

* Die Zahlen in den Klammern sind die Prozente der LAL- bzw. Lys-Gehalte im Ausgangsmaterial.

MLAL=N^{ε}-Methyllysinoalanin (N^{ε}-Methyl-N^{ε}-(2-Amino-2-carboxyäthyl)-L-lysin), LAL=Lysinoalanin, Lys=Lysin, MML=N^{ε}-Methyllysin, DML=N^{ε}-Dimethyllysin, TML=N^{ε}-Trimethyllysin

4. Untersuchung der direkten Methylierung an Poly-L-lysin

An Poly-L-lysin wurde die Methylierung jeweils unter gleichen Bedingungen wie die an Copoly-LAL-Lys durchgeführt, indem 0.1 mMol PLL mit CH_3J mit Hilfe des pH-Staten bei konstanten pH-Werten und Temperaturen umgesetzt wurde. Abb.3 zeigt die Aminosäurechromatogramme einiger Reaktiongemische bei 20°C. Die Ergebinisse sind in der Tab. 4 zusammengestellt.

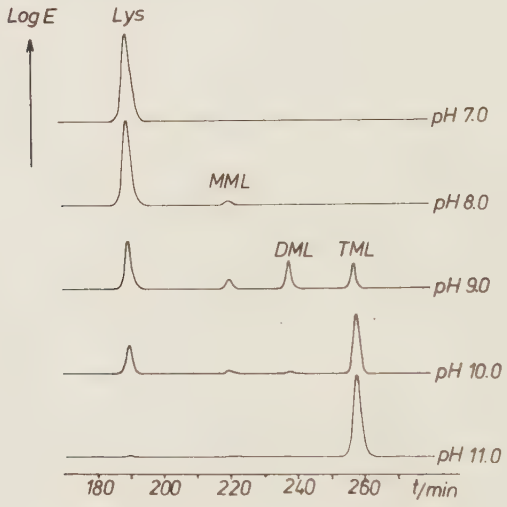


Abb. 3. Aminosäurechromatogramme von Reaktiongemischen aus Poly-L-lysin und CH_3J bei 20°C (Aminosäureanalyse-verfahren Nr. 2)
Lys=Lysin, MML=N^{ε}-Methyllysin, DML=N^{ε}-Dimethyllysin, TML=N^{ε}-Trimethyllysin.

Tab. 4. Aminosäureanalyse der Reaktiongemische aus Poly-L-lysin und CH_3J (Verfahren 2)

	bei 20°C				bei 30°C				bei 40°C			
pH	Lys	MML	DML	TML	Lys	MML	DML	TML	Lys	MML	DML	TML
6	-	-	-	-	100.0	0	0	0	99.4	0.6	0	0
7	100.0	0	0	0	99.3	0.7	0	0	64.8	6.8	1.1	27.4
8	98.4	1.6	0	0	86.7	9.3	0.8	3.2	49.3	17.0	2.1	31.6
9	63.4	6.6	16.3	13.4	9.2	3.3	0.3	87.3	0.4	0	0	99.6
10	34.5	0.8	0.3	64.3	2.8	0	0.3	96.9	0.3	0	0	99.7
11	1.3	0	0	98.7	0	0	0	100.0	-	-	-	-

Wenn man die Ergebnisse in Tab. 4 mit den in Tab.3 vergleicht, ist die Ausbeute an DML bei der direkten Methylierung von PLL viel kleiner als die von Copoly-LAL-Lys unter den selben Bedingungen, daß heißt, die Bildung des TML aus DML erfolgt bei PLL sehr rasch. Somit fand die N^{ε}-Trimethylierung an PLL bei niedrigeren pH-Werten statt. Bei pH 11 und 20°C, pH 10 und 30°C und pH 9 und 40°C wurde ausschließlich TML erhalten.

5. Herstellung des Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysins und Untersuchung der Konformation mit Hilfe des Circular Dichroismuses (CD) und der Optischen Rotations-Dispersion (ORD)

5.1. Herstellung des Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysins durch Methylierung von Poly-L-lysin

Durch die Untersuchung der Methylierung an Poly-L-lysin wurde festgestellt, daß die ε-NH_2-Gruppen des PLL unter bestimmter Bedingung einheitlich trimethyliert werden können. PLL wurde mit Hilfe des pH-Staten unter Rühren 10 St. bei 25°C in pH 10 mit überschüssigem Methyljodid umgesetzt. Über 98 % der gesamten NH_2-Gruppen wurde dadurch trimethyliert, wie die Aminosäureanalyse gezeigt hat. Nach der Reaktion wurde die Reaktionslösung eine Woche gegen 0.01 N HCl, dann 3 Tage gegen Wasser dialysiert, und anschließend durch Gefriertrockenen schwach gebliches Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysin erhalten. Das viskosimetrisch bestimmte Molekulargewicht betrug 165000 (s. Exp. 7.2.2.).

5.2. Untersuchung der Konformation des Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysins mittels Circular Dichroismuses und Optischen Rotations-Dispersion

Die Konformation der Poly-α-Aminosäuren wird von der Art der Seitenketten wesentlich mitbestimmt (1), wobei ihre Größe und ihre verschiedenartigen Wechselwirkungen die Hauptfaktoren sind. Da solche Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, ionische-, polare- und hydrophobe Wechselwirkungen

von den äußeren Bedingungen wie Lösungsmittel, Temperatur, pH-Wert, Art und Konzentration der Elektrolyte stark beeinflußt werden, ist die Konformation von diesen Faktoren abhängig.

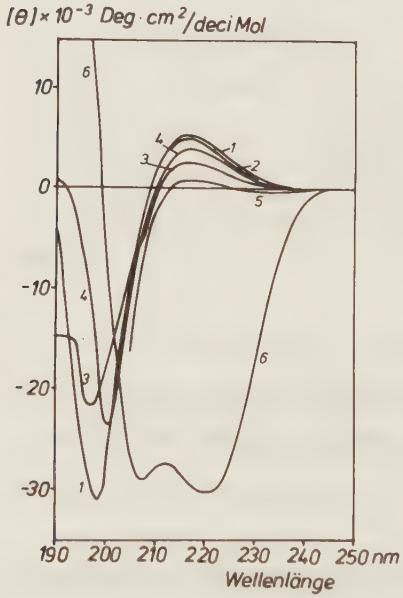
Seit der Entwickelung der ORD- und CD-Techniken zur Konformationanalyse von Polypeptiden und Proteinen (38) wurden umfangreiche Untersuchungen über PLL und dessen Homologe durchgeführt. Bei PLL-Homologen $R = (CH_2)_n - NH_2$ wird die α-Helix mit zunehmender Anzahl n der Methylengruppen stabiler; Poly-L-α,β-diaminopropionsäure (n=1) bildet keine α-Helix (39), Poly-L-α,γ-diaminobuttersäure (n=2) nur zu 10 % (40), Poly-L-ornithin (n=3, PLO) zu 20 % (41) aber PLL zu 100 % (42,43). Die mit n 5 bilden —auch bei partieller Protonierung der Aminogruppen— zu 100 % die α-Helix (44). Auch N^{ε}-modifiziertes PLL wurde in vielen Arbeiten untersucht, um den Einfluß der eingeführten Gruppen auf die Konformation zu charakterisieren; so wurde N^{ε}-Methyl (45,46), N^{ε}-Benzyl (47), N^{ε}-Glutaryl (48), N^{ε}-Succinyl (48) und N^{ε}-Aminosäuresubstituiertes PLL (49) berichtet.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß der eingeführten N^{ε}-Trimethylgruppen und damit der Wirkung von $N^{+}(CH_3)_3$-Ionen auf die Konformation des PLL unter verschiedenen äußeren Bedingungen mit Hilfe von ORD und CD untersucht.

5.2.1. Konformation des Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysins in Wasser

Das CD-Spektrum des Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysins (PTMLL) in wässriger Lösung (Kurve 1 in Abb. 4.) zeigt ein Maximum um 217 nm mit einer Reste-Elliptizität $[\theta]_{217} = + 5520$ Deg·cm^2/deci Mol und ein Minimum bei 198 nm mit $[\theta]_{198} = -31170$

so wie PLL in saurer Lösung. Solche CD-Spektren wurden zuerst als "Ungeordnete Struktur" gedeutet, und als Modell zur Konformationanalyse der natürlichen Proteine verwendet (50). Aber diese Vorstellung wurde später von TIFFANY und KRIMM kritisiert und sie betrachten diese Konformation als "Gestreckte Helix", die der Prolin II-Helix ähnlich ist, jedoch statt 3.0 nur 2.4 Aminosäurereste pro Windung haben soll (51,52). Seitdem wurde dieses Problem ("Ungeordnete Struktur" oder "Gestreckte Helix") in vielen Arbeiten unter verschiedenen Gesichtpunkten untersucht. Aus theoretischen Berechnungen und experimentellen Ergebnissen scheint die "Getreckte Helix" eher akzeptabel zu



Kurve

1 :	PTMLL	pH 5.56,	22°C
2 :	PTMLL	pH 11.38,	22°C
3 :	PTMLL	pH 5.56,	80°C
4 :	PLL	pH 5.80,	22°C
5 :	PLL	pH 5.80,	70°C
6 :	PLL	pH 11.22,	22°C

Abb. 4. CD-Spektren des PLL und des PTMLL in Wasser
Konzentration (c) 0.01 %
Küvettendicke 1.0 cm

sein als die "Ungeordnete Struktur", obwohl auch einige Tatsachen dagegen sprechen (53,54,55,56). (Die Arbeiten über dieses Thema werden in Ref. 57 zusammengestellt.)

Diese "Gestreckte Helix"-Struktur des PLL in "saurem" Medium wird damit erklärt, daß die oberhalb pH 10.1 (pK-Wert der ε-NH_2-Gruppe) existierende α-Helix des PLL infolge der Protonierung der Aminogruppen und der damit verbundenen elektrostatischen Abstoßung der NH_3^+-Gruppen zerstört wird (pH-induzierte Ordnungsumwandlung). Dagegen brachte eine pH-Änderung bei PTMLL nur einen geringen Effekt auf die Struktur, wie aus dem Spektrum (Kurve 2 in Abb. 4) hervorgeht.
Wie erwartet, wird durch die Einführung der stark basischen $N(CH_3)_3^+$-Gruppen die Möglichkeit zur Deprotonierung genommen, so daß die elektrostatische Abstoßung zwischen den Seitenketten des PTMLL von der pH-Änderung kaum beeinflußt wird.

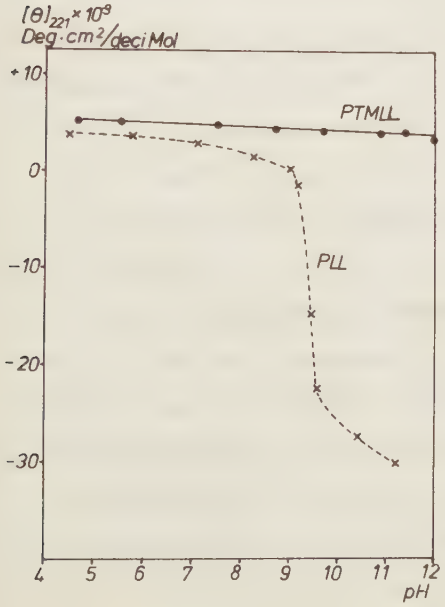


Abb. 5.

pH-Abhängigkeit der $[\theta]_{221}$-Werte von PLL (x) und PTMLL (o)
c=0.01 %, bei 22°C,
Küvettendicke 1.0 cm

Dieser unterschiedliche Effekt der pH-Änderung auf die Struktur des PLL und PTMLL wurde in Abb. 5 gezeigt, indem die Reste-Elliptizitäten bei 221 nm $[\theta]_{221}$ gegen den pH-Wert aufgetragen wurden. Die Reste-Elliptizitäten der CD-Spektren von PLL und PTMLL in wässrigen Lösungen sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Tab. 5. Reste-Elliptizitäten des PLL und PTMLL in Wasser Konzentration der Polypeptide 0.01 %, Küvettendicke 1.0 cm

		Maxima		Minima	
		nm	$[\theta]$	nm	$[\theta]$(Deg·cm^2/deciMol)
PTMLL	pH 5.56, 22°C	217	+5220	198	-31170
	pH 5.56, 80°C	217	+2610		
	pH 11.38, 22°C	217	+4080		
PLL	pH 5.80, 22°C	217	+4850	201	-23320
	pH 5.80, 70°C	217	+ 780		〈neg. Schulter bei 233nm,$[\theta]$=-380
	pH 11.22, 22°C	191	+68500	221	-30170
				207	-28850

Wie von TIFFANY und KRIMM (58) und NEUMANN et al. (59) gefunden wurde, zeigten CD-Spektren von PLL in Wasser bei 70°C (Kurve 5 in Abb. 4) eine kleine negative Schulter um 233 nm mit einer Reste-Elliptizität $[\theta]$= -380 Deg·cm^2/deciMol und das ursprünglich vorhandene Maximum bei 217 nm nahm von $[\theta]_{217}$= +4850 Deg·cm^2/deciMol auf +780 ab. Damit ist es ähnlich den berechneten CD-Spektren für "Ungeordnete-Struktur" natürlicher Proteine, deren Strukturen durch Röntgenbeugung bekannt sind (60,61). Wie man an Kurve 3 in Abb. 4 erkennt, zeigte das CD-Spektrum von PTMLL bei 80°C nur eine relativ geringe Änderung; der maximale $[\theta]_{217}$-Wert nahm mit steigender Temperatur allmählich ab, aber es trat keine negative Schulter auf.

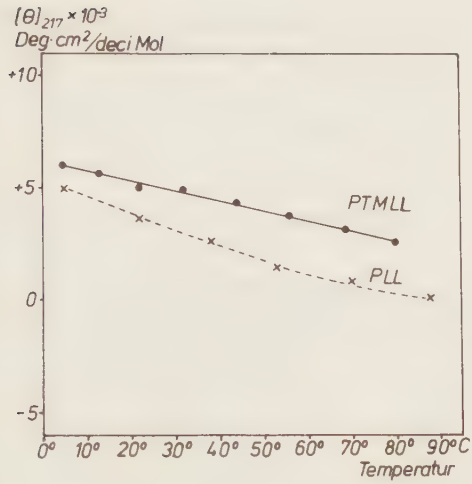


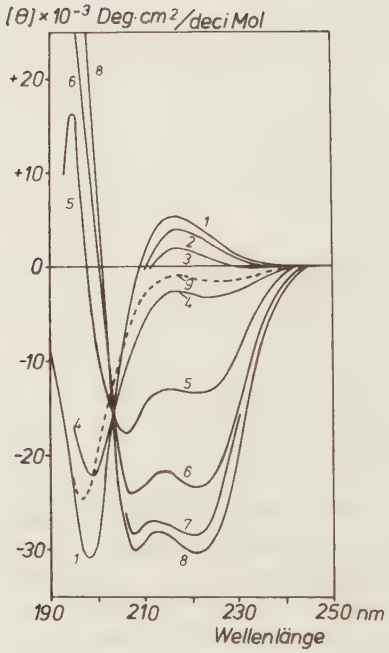
Abb. 6. Temperatur-Abhängigkeit der $[\theta]_{217}$-Werte von PLL (x) und PTMLL (o) in sauren wässrigen Lösungen. c=0.01 %, pH-Werte bei 22°C PTMLL : 5.56 und PLL : 5.80, Küvettendicke 1.0 cm

Der Einfluß der Temperatur auf PLL und PTMLL in sauren pH-Bereich wurde in Abb. 6 verglichen, wobei die $[\theta]_{217}$-Werte gegen die Temperatur aufgetragen wurden. Daraus scheint hervorzugehen, daß die "Gestreckte Helix" von PTMLL thermisch stabiler ist als die von PLL.

5.2.2. Konformation in Elektrolyt-Lösungen

5.2.2.1. In Perchlorat-Lösungen

Bekanntlich wirkt Perchlorat in völligem Gegensatz zu seiner destabilisierenden Wirkung bei nativen Proteinen im Falle der basischen Poly-α-Aminosäuren stabilisierend auf die α-helicale Konformation, und zwar unabhängig vom Kation (2,4,62,63).



Konzentration an $NaClO_4$ der Lösungen

1 : 0 Mol/l
2 : $1.0 \cdot 10^{-3}$
3 : $2.5 \cdot 10^{-3}$
4 : $4.0 \cdot 10^{-3}$
5 : $5.0 \cdot 10^{-3}$
6 : $8.0 \cdot 10^{-3}$
7.: $1.0 \cdot 10^{-2}$
8 : $3.0 \cdot 10^{-2}$
9 : $3.0 \cdot 10^{-2}$ bei 62°C

Abb. 7. CD-Spektren des PTMML in $NaClO_4$-Lösungen
c=0.01 %, Küvettendicke 1.0 cm
bei 22°C, pH 5.5

Abb.7 zeigt CD-Spektren des PTMLL in Perchlorat-Lösungen. Die Doppelminima um 208 nm und 221 nm der CD-Spektren für die α-Helix traten schon in der 0.008 M $NaClO_4$-Lösung auf. In 0.03 M $NaClO_4$-Lösung wurde für das Minimum bei 208 nm eine Reste-Elliptizität von -30000 Deg·cm²/deci Mol und für das bei 221 nm ein Wert von -30250 erhalten. Diese Ordnungsumwandlung des PTMLL geschah bei viel niedrigerer ClO_4^--Konzentration als die des PLL, wie aus Abb. 8 hervorgeht, wobei die $[\theta]_{221}$-Werte gegen den Logarithmus der $NaClO_4$-Konzentration aufgetragen wurden. Die Werte von PLL-$NaClO_4$ wurden aus der Arbeit von E. PEGGION et al. (63) entnommen. Während der Mittelpunkt der Umwandlung des Systems PLL-$NaClO_4$ bei 0.21 Mol

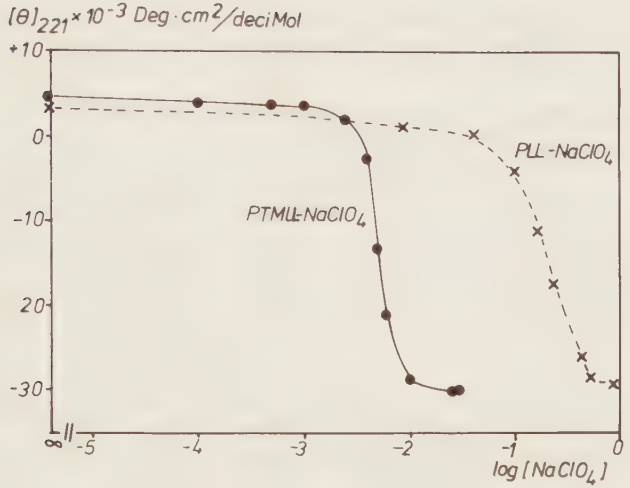


Abb. 8. Abhängigkeit der $[\theta]_{221}$-Werte von PLL (x) und PTMLL (o) vom Logarithmus der $NaClO_4$-Konzentration [PTMLL] = $4.9 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, Küvettendicke 1.0 cm, bei 22°C pH 5.5 [PLL] = 0.01 %, PLL-$NaClO_4$: aus der Arbeit von PEGGION et al. (63)

$NaClO_4$-Konzentration liegt, beträgt die Umwandlungskonzentration beim System PTMLL-$NaClO_4$ nur etwa 0.005 M $NaClO_4$, wie aus Abb. 8 hervorgeht. Außerdem zeigt die Umwandlung von PTMLL-$NaClO_4$ einen schärferen und damit kooperativeren Übergang als die von PLL-$NaClO_4$. $LiClO_4$ brachte das selbe Ergebnis wie $NaClO_4$. In der Arbeit von EBERT über PLL-ClO_4^- (3,4) wurde gefolgert, daß Perchlorationen um die rechtsgängige α-Helix des Polypeptidkettengerüstes eine linksgängige Superhelix bilden, wodurch eine optimale Abschirmung gegenüber den sich gegenseitig abstoßenden positiven Ladung der ε-NH_3^+-Gruppen erzielt wird. Sicherlich wird beim System PTMLL-ClO_4^- diese Superhelix entstehen, wodurch die α-Helix stabilisiert wird. Diese α-Helix von PTMLL-$NaClO_4$ wurde erwartungsgemäß von der pH-Änderung nicht beeinflußt, wie bei PLL-ClO_4^-.

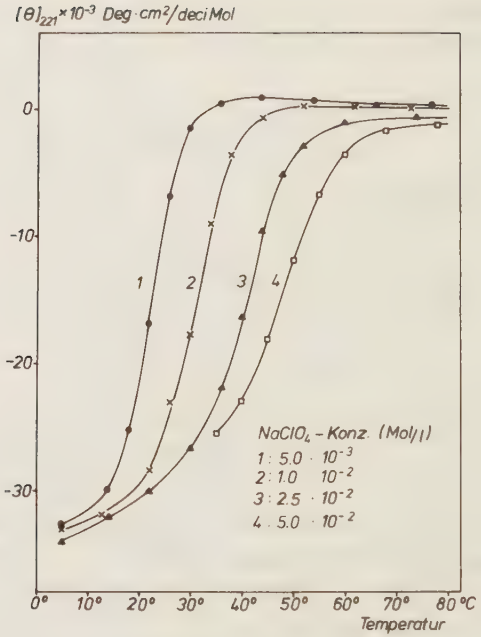


Abb. 9. Abhängigkeit der $[\theta]_{221}$-Werte des PTMML in $NaClO_4$-Lösungen von Temperatur
c= 0.01 %, Küvettendicke 1.0 cm,

Mit steigender Temperatur wird sie aber zerstört und geht in eine ungeordnetere Struktur über, wie aus dem CD-Spektrum (Kurve 9 in Abb. 7) hervorgeht. Die temperaturinduzierte Ordnungsumwandlung von PTMLL-$NaClO_4$ ist in Abb. 9 gezeigt, in dem die $[\theta]_{221}$-Werte gegen die Temperatur aufgetragen wurden. In 0.05 M $NaClO_4$-Lösung mußte oberhalb 35°C gemessen werden, denn unter 35°C entstanden feine Niederschläge. In Abb. 9 kann man sehen, daß die Umwandlungskurven mit der ClO_4^--Konzentration immer flacher werden, und daß die Stufenhöhe $\triangle [\theta]_{221}$ mit der ClO_4^--Konzentration abnimmt. Dieses Phänomen wurde auch an den polarimetrisch ermittelten Umwandlungskurven

am System PLL-ClO_4^- beobachtet (3,4). Aus dem flacher werdenden Verlauf kann man zunächst auf eine abnehmende Kooperativität der Umwandlung schließen. Die ebenfalls abnehmende Stufenhöhe weist darauf hin, daß der Ordnungsgrad oberhalb der Umwandlung mit der Konzentration an ClO_4^- größer wird (Kurve 9 in Abb. 7). Die Moleküle können also bei hoher ClO_4^--Konzentration nicht in einen so ungeordneten Zustand übergehen wie bei niedrigerer Elektrolytkonzentration.

Diese sogenannte Helix-Knäuel-Umwandlung ist ein kooperatives Phänomen, d.h. der Zustand eines Segmentes beeinflußt den der benachbarten, so daß sich eine solche Umwandlung über eine Folge von Resten erstreckt. Nach ZIMM und BRAGG (64) wurde diese kooperative Umwandlung durch die Einführung einiger Parameter charakterisiert; Handelt es sich um eine Konformationsumwandlung vom Zustand A in den Zustand B, wobei z.B. A eine helicale Konformation und B eine knäuelförmige oder andere helicale Konformation darstellt, so findet die Konformationsänderung nach der Bildung von Keimen des Zustandes B mit der Gleichgewichtskonstante $\sigma \cdot s$ als ein Kettenwachstum des B-Zustandes mit der Gleichgewichtskonstante s statt. Dabei wird σ als Kooperativitätsparameter bezeichnet. Bei dem Mittelpunkt der Umwandlung Tm liegt die Hälfte der Molekeln im Zustand A und die andere Hälfte im Zustand B vor ($f_H = 1/2$). Für den Helixanteil f_H gilt nun nach APPLEQUIST (65):

$$f_H = 1/2 + (s - 1)/ 2 \left[(1 - s)^2 + 4s\sigma\right]^{1/2} \qquad [1]$$

Für den Mittelpunkt der Umwandlung ($f_H = 1/2$) ergibt sich, daß $s = 1$ sein muß und damit der gesamte 2. Term entfällt, der den die Kooperativität charakterisierenden Parameter σ enthält. Man kann daher die Umwandlung bei Tm als normales chemisches

Gleichgewicht zwischen intrachenar geschlossenen und geöffneten Wasserstoffbrücken betrachten. Es gilt;

$$\ln s = \left[(\Delta S/R) - (\Delta H_o / RT_m)\right] = 0 \qquad [2]$$

damit also

$$\Delta G = \Delta H_o - Tm\Delta S_o = 0 \qquad [3]$$

Differenziert man ln s nach 1/T (Gl. 2), so erhält man

$$\frac{d \ln s}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H_o}{R} \qquad [4]$$

Andererseits erhält man für

$$\partial f_H / \partial \ln s = 1/ 4\sigma^{1/2} + \cdots\cdots \qquad [5]$$

wobei der 2. Term bei kleinem σ zu vernachlässigen ist.

Man erhält dann:

$$\frac{\partial f_H}{\partial 1/T} = -\frac{H_o}{4R\sigma^{1/2}} \qquad [6]$$

Der Quotient $\frac{\Delta H_o}{\sigma^{1/2}}$ wird als "scheinbare" oder "van't Hoffsche Umwandlungswärme" ΔH_{vH} im Unterschied zur wahren Umwandlungswärme ΔH_o bezeichnet. ΔH_{vH} ist die Wärmemenge, die bei der Ordnungsunwandlung einer kooperativen Kettenlänge ($= \sigma^{1/2}$) auftritt, und kann als Maß für die Kooperativität einer Umwandlung in 1. Näherung gelten.

Aus den Umwandlungskurven in Abb. 9 wurde f_H nach der folgenden Beziehung ermittelt.

$$f_H = \frac{[\theta]_{221} - [\theta]_{221,U}}{[\theta]_{221,H} - [\theta]_{221,U}}$$

f_H : Helix-Anteil

$[\theta]_{221}$: gemessene Reste-Elliptizität bei 221 nm

$[\theta]_{221,H}$: Reste-Elliptizität bei 221 nm für einen α-Helixanteil von 100 % bei der jeweiligen ClO_4^- - Konzentration

$[\theta]_{221,U}$: Reste-Elliptizität bei 221 nm für einen α-Helixanteil von 0 % bei der jeweiligen ClO_4^--Konzentration

Durch die Auftragung der f_H-Werte gegen 1/T wurde T_m bestimmt. Aus der Neigung der Geraden bei T_m nach Multiplizieren mit 4R wurde ΔH_{vH} erhalten. Die so ermittelten T_m wurden gegen die ClO_4^--Konzentration aufgetragen (Abb. 10). T_m wird hiernach mit der ClO_4^--Konzentration noch immer höheren Werten hin verschoben, wie es auch bei der Untersuchung über PLL-ClO_4^--Komplexe gefunden wurde(4). In Abb. 11 wurden auch die ermittelten ΔH_{vH} gegen die ClO_4^--Konzentration aufgetragen. Die starke Abnahme von ΔH_{vH} mit steigender ClO_4^--Konz. deutet auch auf eine abnehmende Kooperativität hin. Die relativ höheren ΔH_{vH}-Werte des PTMLL-ClO_4^--Komplexes gegenüber denen des PLL (40-20 kcal bei 0.1-2.0 molarer ClO_4^--Konz. Ref.4)

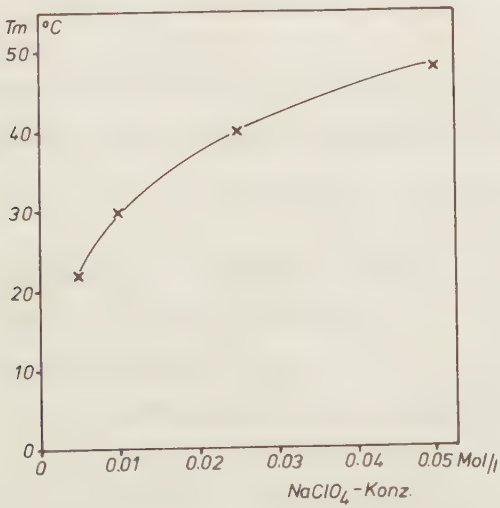


Abb. 10. Umwandlungstemperaturen T_m von PTMLL-$NaClO_4$ als Funktion der Perchloratkonzentrationen

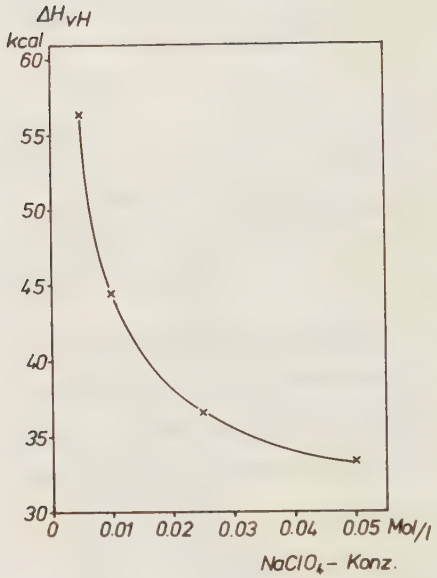


Abb. 11.
Abhängigkeit der scheinbaren Umwandlungswärme ΔH_{vH} des PTMLL von der Perchloratkonzentration

weisen auch auf eine höhere Kooperativität bei PTMLL als bei PLL hin.

Die Existenz des die Superhelix bildenden PTMLL-ClO_4^--Komplexes wird durch die Lage des Dissoziationsgleichgewichtes bestimmt.

$$PTMLL^{n+}\ (ClO_4^-)_n \rightleftharpoons PTMLL^{n+} + n\ ClO_4^-$$

Da quartäre Ammoniumsalze als starke Elektrolyte vollständig dissoziert sein sollten, ist die beobachtete Stabilisierung der α-Helix des PTMLL aufgrund einer o.a. Komplexbildung nur durch spezifische Wechselwirkungen des Polykations mit dem Perchlorat denkbar. Damit wird die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung $K = \frac{[PTMLL^{n+}(ClO_4^-)_n]}{[PTMLL^{n+}]\ [ClO_4^-]^n}$ sehr groß. Solche Komplexe aus basischen Poly-α-Aminosäuren und Perchlorat(4,63)

können z.B. durch Sedimentationsgeschwindigkeitsbestimmung nachgewiesen werden (15). Die thermisch induzierte Ordnungsumwandlung von PTMLL-ClO_4^- wird damit auch durch die Dissoziation dieses Komplexes bestimmt. Mit steigender ClO_4^--Konz. wird naturgemäß dieses Gleichgewicht immer weiter nach links verschoben bzw. man muß immere höhere Temperaturen anwenden, um eine relevante Verschiebung nach rechts und damit eine Ordnungsumwandlung zu erzielen. Da aber die Dissoziation kein kooperativer Vorgang ist, resultiert die beobachtete Abnahme der Kooperativität der Umwandlung.

Bei ClO_4^--Konzentrationen größer als 0.03 Mol/l wurden die Lösungen trüb und mit der Zeit fiel ein feiner Niederschlag aus. Wie die CD-Spektren dieser Lösungen (Abb. 12) zeigen, wurde das ursprüngliche Minimum bei 208 nm zu einer Schulter und das Minimum bei 221 nm nach 225 nm verschoben. Die absolute Reste-Elliptizität am Minimum bei 225 nm $[\theta]_{225}$ nahm mit steigender ClO_4^--Konz. allmählich ab. Der minimale $[\theta]_{222}$-Wert wurde bei 0.05 molarer $NaClO_4$ als -26850 Deg·cm^2/deciMol erhalten und damit absolut wesentlich kleiner als der bei 0.03 molarer $NaClO_4$ von -31100 (der α-Helix). Die CD-Spektren in Abb. 12 konnten eine halbe Stunde nach der Herstellung aus den Komponenten ungeändert aufgenommen werden, und waren unabhängig von der Schichtdicke.
Solche CD-Spektren mit einem Minimum um 220-225 nm und einer Schulter um 210 nm wurden bei Untersuchungen mit PLL-NaOctylsulfat, PLO-NaDodecylsulfat (66) und PLL-Phosphatidylserin(67) als α-Helix interpretiert. Ähnliche Spektren von PLL-PLGS(68) und PLL in i-Propanol mit NaCl (69) werden als die der β-Faltblattstruktur oder bei Poly-N^{ϵ}-Glycyl-L-lysin (49) als Gemisch von α- und β-Struktur betrachtet.

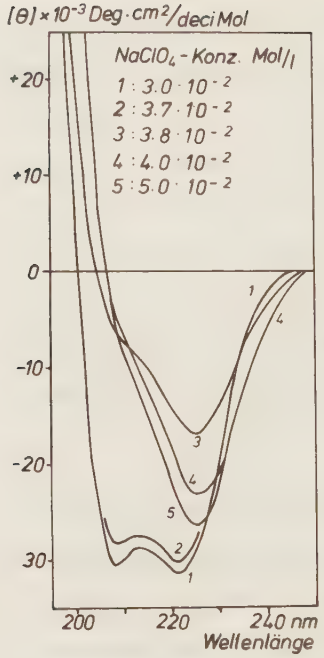


Abb. 12.
CD-Spektren von PTMLL in $NaClO_4$-Lösung oberhalb 0.03 Mol/l, c=0.01 %, bei 22°C, Küvettendicke(d) 1.0 cm

Lösungszustand
1) keine Trübung
2) beginnende Trübung
3) trüb, nach ca.30Min. konstant
4) trüb, " "
5) trüb, " "

Die PTMLL-Lösungen in 0.03 bis 0.1 M $NaClO_4$ wurden mit 18000 U/Min. 15 Min. bei 22°C zentrifugiert und die Niederschläge wurden von den überstehenden klaren Lösungen getrennt. Die überstehenden Lösungen unterhalb von 0.05 molarer $NaClO_4$-Konz. zeigten noch ein CD-Spektrum mit Doppelminima bei 221 und 208 nm der α-Helix, dagegen zeigten die der höheren $NaClO_4$-Konz. keine CD-Effekte. In den CD-Spektren der wieder suspendierten Niederschläge trat nur ein Minimum um 225 nm auf(Ein Beispiel in Abb. 13). In Abb. 14 kann man erkennen, wobei die $[\theta]_{221}$-Werte in CD-Spektren der überstehenden Lösungen sowie die der Ausgangslösung mit Niederschlag gegen ClO_4^--Konz. aufgetragen wurden, daß die Bildung der Niederschläge im engen Bereich der ClO_4^--Konz. (0.03-0.05 Mol/l) stattfindet. Bei ClO_4^--Konz. größer als etwa 0.1 Mol/l wurden die Niederschläge dicker und nach der kürzeren Zeit abgesetzt.

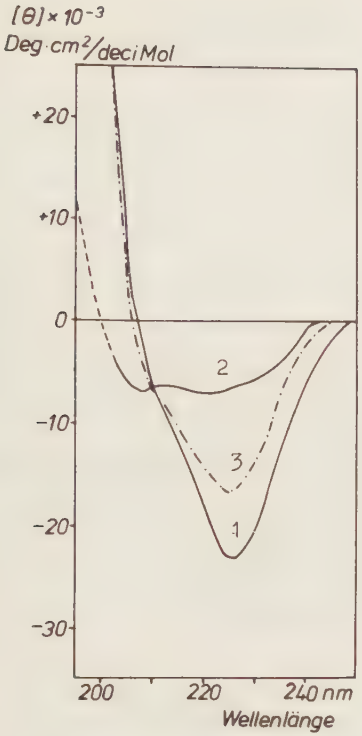


Abb. 13.
CD-Spektren des PTMLL in 0.04 molarer $NaClO_4$-Lösung
1) Ausgangslösung mit Niederschlag
2) Überstehende klare Lösung nach der Zentrifugierung
3) suspendierter Niederschlag

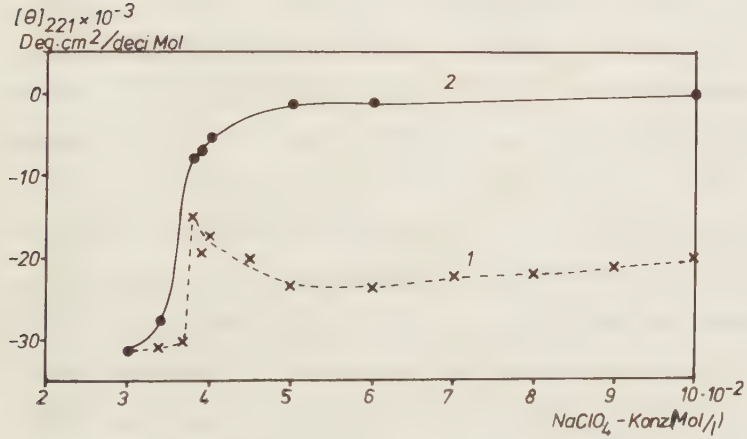


Abb. 14. Abhängigkeit der $[\theta]_{221}$-Werte des PTMLL von der $NaClO_4^-$-Konzentration (0.02-0.1 Mol/l).
1) Ausgangslösung mit Niederschlag
2) Überstehende Lösung nach der Zentrifugierung

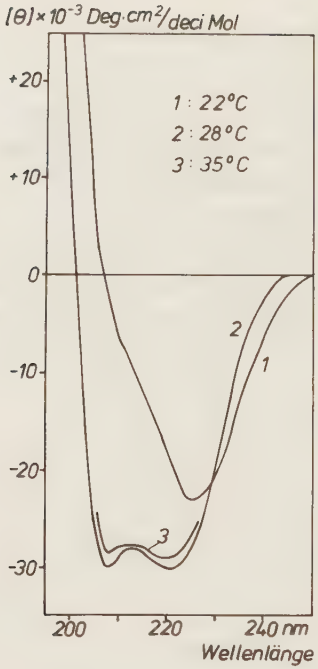


Abb. 15.
CD-Spektren des PTMLL in 0.04 molarer $NaClO_4$-Lösung
1) trübe Lösung
2) klare Lösung
3) klare Lösung

Diese Niederschläge wurden jedoch bei hoher Temperatur wieder aufgelöst, wobei mit steigender ClO_4^--Konz. die zum Auflösen notwendige Temperatur zunahm. Dabei waren die Löslichkeiten der Niederschläge vor allem im Übergangsbereich gegen Temperatur sehr empfindlich. Die so aufgelösten PTMLL-ClO_4^--Lösungen zeigten wieder das CD-Spektrum der α-Helix (Abb. 15). CASSIM und YANG hatten auch gezeigt, daß ORD- und CD-Spektren der Poly-L-Glutaminsäure nach Aggregation zu längeren Wellenlängen verschoben werden (70). Deshalb scheint es sich nur um einen Aggregationseffekt im CD-Spektrum zu handeln, aber immerhin ist die Möglichkeit einer Ordnungsumwandlung nicht auszuschließen, da die Struktur der Polypeptide sich bei der Aggregation ändern kann.

5.2.2.2. in Sulfat- und Natriummethylsulfat-Lösungen

Im Gegensatz zu den Perchlorationen bewirken Sulfationen bekanntlich keine Stabilisierung der α-Helix basischer Poly-α-Aminosäuren (4).

Das CD-Spektrum des PTMLL in Sulfat-Lösung (Kurve 2 in Abb.16) zeigt eine geringe Änderung im Vergleich zu dem in Wasser. Die Reste-Elliptizität am Maximum bei 217 nm $(\theta)_{217}$ nahm von +4560 Deg·cm^2/deciMol in Wasser auf +4120 in 1.5 molarer Li_2SO_4-Lösung ab, aber diese Abnahme ist viel kleiner als die bei PLL, da $(\theta)_{217}$ des PLL von +4100 Deg·cm^2/deciMol in Wasser auf +1360 in derselben Li_2SO_4-Lösung abnahm.

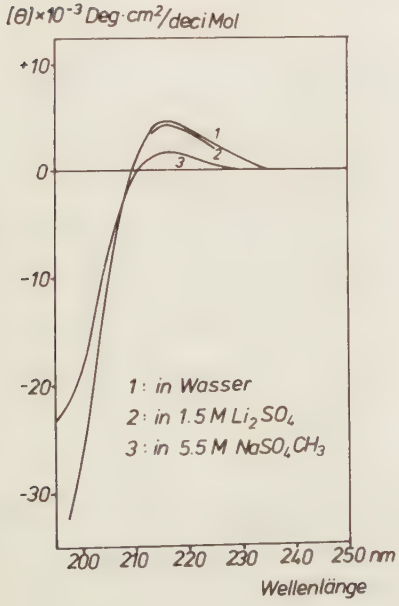


Abb. 16.
CD-Spektren des PTMLL
c=0.04 %, bei 22°C,
Küvettendicke 0.1 cm

Dieses Fehlen einer die α-Helix von PLL stabilisierenden Wirkung der Sulfationen unterhalb des pK-Wertes der seitständigen Gruppe könnte darauf zurückgeführt werden, daß Sulfationen nicht wie die Perchlorationen von PLL spezifisch absorbiert werden, worauf Sedimentationsuntersuchungen hinweisen (15). Außerdem trägt das Sulfation zwei negative Ladungen und somit resultiert bei der Einlagerung zwischen NH_3^+- oder $N(CH_3)_3^+$-Gruppen eine negative Überschußladung längs der Kette. Diese elektrostatische Abstoßung würde die Helixbildung auch behindern.

In der Arbeit von EBERT et al. (4) wurde gezeigt, daß eine α-Helixbildung bei PLL durch Alkylsulfationen mit nur einer negativen Ladung in hoher Konzentration ermöglicht wurde(Abb.17).

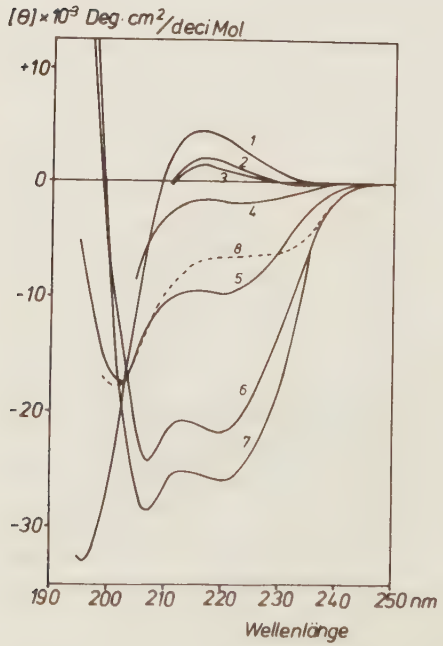


Abb. 17.
CD-Spektren des PLL in NaMethylsulfat-Lösungen c=0.04 %, bei 22°C, Küvettendicke 0.1 cm

NaMethylsulfat-Konz. der Lösungen
1) 0 Mol/l
2) 0.84
3) 1.78
4) 2.67
5) 3.56
6) 4.44
7) 5.50
8) 5.50 bei 80°C

Die zur α-Helixbildung erforderliche hohe Konzentration an Elektrolyt kann wohl auf die hohe Dissoziationskonstante des PLL-NaMethylsulfat-Komplexes zurückgeführt werden. Mit steigender Temperatur wird diese α-Helix des PLL-Methylsulfat$^-$ zerstört, und geht in eine ungeordnete Struktur über, wie aus dem CD-Spektrum (Kurve 8 in Abb. 17) hervorgeht. Diese thermische Ordnungsumwandlung ist sehr wenig kooperativ, worauf die fast lineare Umwandlungskurve in Abb. 18 hinweist, wobei Reste-Elliptizitäten bei 221 nm $[\theta]_{221}$ gegen die Temperatur aufgetragen wurden.

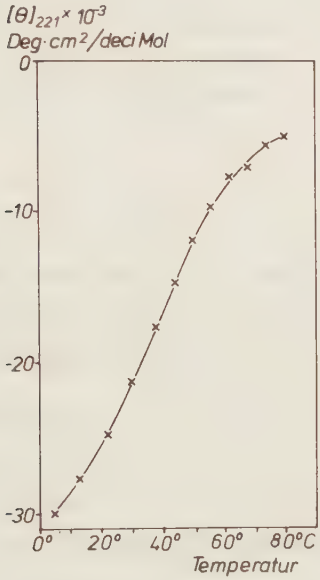


Abb. 18. Abhängigkeit der $[\theta]_{221}$-Werte des PLL in 5.5 molarer NaMethylsulfat von der Temperatur c = 0.04 %, Küvettendicke 0.1 cm

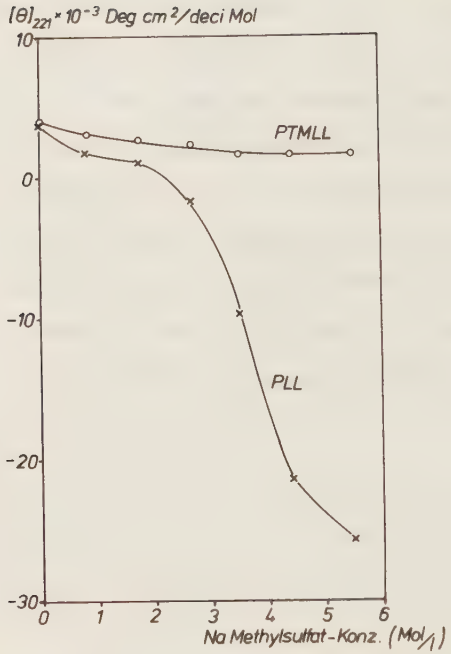


Abb. 19.
Abhängigkeit der $[\theta]_{221}$-Werte des PLL(x) und PTMLL(o) von der NaMethylsulfat-Konz.

Wie aus dem CD-Spektrum (Kurve 3 in Abb. 16) hervorgeht, bildete PTMLL im Gegensatz zum PLL auch bei hoher $CH_3SO_4^-$-Konzentration keine α-Helix, obwohl die Reste-Elliptizität am Maximum bei 217 nm $[\theta]_{217}$ zu +1610 Deg·cm²/deciMol (in Wasser +4560) herabgesetzt wurde. Die Abb. 19 veranschaulicht diese gegensätzliche Wirkung der $CH_3SO_4^-$-Ionen auf die Konformationen des PLL und PTMLL, wobei $[\theta]_{221}$-Werte gegen die NaMethylsulfat-Konzentration aufgetragen wurden. Dies weist darauf hin, daß die gegenseitige elektrostatische Abstoßung zwischen ε-$N(CH_3)_3^+$-Gruppen des PTMLL größer ist als die zwischen den ε-NH_3^+-Gruppen des PLL, um von $CH_3SO_4^-$-Ionen abgeschirmt zu werden, bzw. daß die $CH_3SO_4^-$-Ionen von PTMLL erheblich weniger spezifisch adsorbiert werden als von PLL.

5.2.2.3. In Rhodanide-Lösungen

Bekanntlich wirken Rhodanidionen (Thiocyanationen) wie Perchlorationen im Gegensatz zu ihrem destabilisierenden Einfluß auf native Proteine stabilisierend auf die α-Helix der basischen Poly-α-Aminosäuren (40,71,72,73).
In Abb. 18 wurden MOFFIT-YANGśche Parameter (74,75) b_o-Werte der ORD-Spektren vom PTMLL in verschiedenen Salzlösungen gegen den Logarithmus der Salzkonzentration aufgetragen. Die Werte von PLL-NaSCN wurden aus der Arbeit von SUGAI et al. (73) entnommen. Wie bei anderen Polypeptiden in "Ungeordneten Zustand" betrug der b_o-Wert des PTMLL in wässriger Lösung 0. Oberhalb 0.1 molarer NaSCN-Lösungen liegt PTMLL als α-Helix vor, wie aus der Abb. 20 hervorgeht.

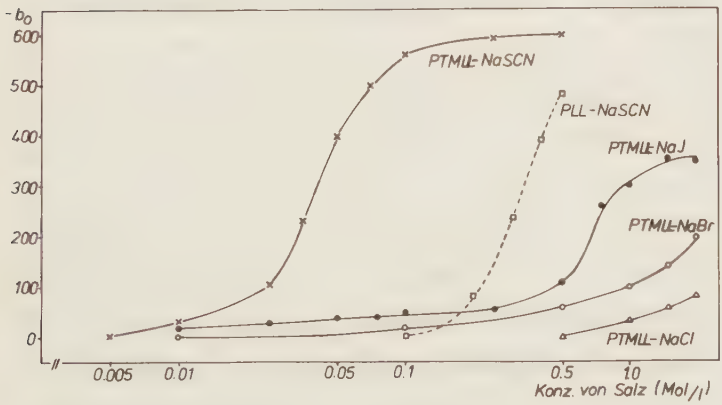


Abb. 20. MOFFIT-YANGśche Parameter, b_o-Werte des PTMLL in Salzlösungen
c = 0.1 %, Küvettendicke 1.0 cm, bei 22°C

Der b_o-Wert des PTMLL in 0.1 molarer NaSCN-Lösung betrug -560, das bedeutet 89 %-igen α-Helixanteil, wenn wir den b_o-Wert für die reine α-Helix als -630 und für die ungeordnete Struktur als 0 annehmen. Der α-Helixanteil (in %) ergibt sich aus $b_o/630$ x 100 % (74,75). In 0.5 molarer NaSCN-Lösung reichte der b_o-Wert bis zu -600 (95 %-iger Helixanteil). Die Ordnungsumwandlungskonzentration für SCN^-, bei der der Helixanteil 50 % beträgt, liegt beim PTMLL-NaSCN um 0.04 Mol/l-SCN^-, dagegen betrug sie beim PLL-NaSCN etwa 0.4 Mol/l-SCN^- (73). Diese Beobachtungen stimmen mit den Untersuchungsergebnissen an PLL-ClO_4^- und PTMLL-ClO_4^- überein, allerdings ist der helixstabilisierende Effekt des SCN^--Ions auf PTMLL etwas kleiner als der des ClO_4^--Ions.

SUGAI et al. haben am PLL und Poly-L-homoarginin (PLHA) gezeigt, daß die α-Helix des PLHA auch durch geringere Konzentration an Thiocyanat bzw. Perchlorat stabilisiert wurde als bei PLL. Die Autoren machen den strukturbrechenden Charakter dieser Anionen gegenüber dem Wasser für die Stabilisierung der α-Helix verantwortlich. Hierdurch soll die spezifische Adsorption von Anionen wie J^-, SCN^-, ClO_4^- durch die Polykationen ermöglicht werden. Anderseits soll nach den Ergebnissen dieser o.a. Untersuchungen an PLL und PLHA diese spezifische Wechselwirkung ebenso mit zunehmender strukturbrechender Wirkung der ionogen Gruppen des Polykations erhöht werden. Für die Stabilisierung der α-Helix des PTMLL sind nun wesentlich geringere Anionen Konzentrationen erforderlich als bei PLL. So beträgt die Konzentration von ClO_4^- am Mittelpunkt der Ordnungsumwandlung $C_m^{ClO_4^-}$ bei PTMLL nur 0.005 Mol/l, aber bei PLL 0.21 Mol/l. Deshalb folgt offenbar daß der strukturbrechende Effekt der ε-$N(CH_3)_3^+$-Ionen

gegenüber dem Wasser erheblich größer sein sollte als der NH^{+}_{3}-Gruppen des PLL. Dieser stark strukturbrechende Charakter des ε-$N(CH_3)_3^{+}$-Ions sorgt für eine starke Bindung mit dem Perchlorat bzw. Thiocyanation, die ebenfalls stark strukturbrechende Anionen sind, damit könnte die Bildung des Polypeptide-Ion-Komplexes begünstigt werden, wodurch die gegenseitig abstoßenden geladenen Seitenketten optimal abgeschirmt würden.

Daß Sulfat dagegen die Helix nicht stabilisiert, könnten wir in diesem Zusammenhang so annehmen, daß durch seinen strukturbildenden Charakter die Bildung eines Polypeptide-Ion-Komplexes ungünstig würde und damit geringe Abschirmeffekte resultieren würde.

5.2.2.4. in Chlorid-, Bromid- und Jodid-Lösungen

Chloridionen stabilisieren bekanntlich so gut wie nicht die α-Helix basischer Poly-α-Aminosäuren (40,51). SUGAI et al. haben auch gezeigt, daß neben Perchlorat und Thiocyanat auch andere Anionen wie Bromid und Jodid die α-Helix des PLL und PLHA stabilisieren. Die unterschiedlichen strukturbrechenden Wirkungen dieser Anionen gegenüber dem Wasser werden für die von der Art des Anions abhängige Wechselwirkung mit den basischen Seitenketten und der hiervon ebenfalls abhängigen Stabilisierung der α-Helix verantwortet. Die Stabilität nimmt mit folgender Ionenreihe ab; $SCN^- \approx ClO_4^- > J^- > Br^- > Cl^-$ (73). Dabei wird diese interionische Wechselwirkung dadurch begünstigt, daß die Ammonium- bzw. Guanidiumionen des PLL bzw. PLHA Strukturbrecher sind.

Da ε-$N(CH_3)_3^+$-Ionen noch einen stärkeren strukturbrechenden Charakter gegenüber dem Wasser haben, wie aus den Untersuchungen mit Perchlorat und Thiocyanat hervorgeht, können wir auch starke Wechselwirkungen des PTMLL mit diesen anderen Anionen erwarten. In Abb. 21 wurden CD-Spektren des PLL und PTMLL in 3.5 molarer $CaCl_2$-Lösung gezeigt. Das CD-Spektrum des PLL (Kurve 2) zeigt nur eine Schulter um 217 nm mit der Reste-Elliptizität $[\theta]_{217}$ = -2200 Deg·cm/deciMol. Dieses Spektrum ist damit dem denaturierter Proteine ähnlich, und wurde von TIFFANY und KRIMM (51) für die "Ungeordnete Struktur" des PLL betrachtet. Dagegen zeigt PTMLL in derselben $CaCl_2$-Lösung eine kleinere Änderung im CD-Spektrum (Kurve 1). Die Reste-Elliptizität am Maximum bei 217 nm $[\theta]_{217}$ nahm von +4560 Deg·cm^2/deciMol in Wasser zu +420 stark ab, und es trat eine flache negative

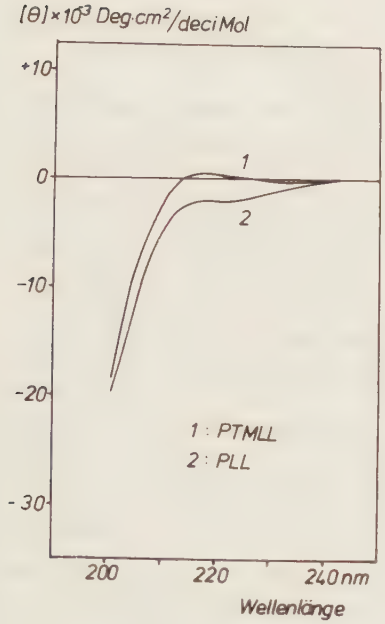


Abb. 21.

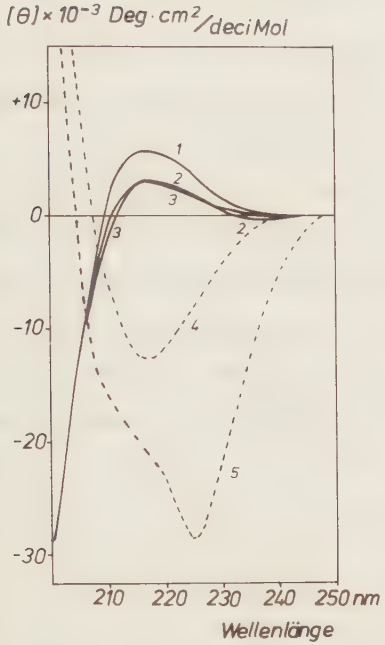
CD-Spektren des PTMLL (1) und PLL (2) in 3.5 molarer $CaCl_2$-Lösungen c=0.04 %, bei 22°C, Küvettendicke 0.1 cm

Schulter bei 232 nm mit $[\theta]_{232}$ = -310 auf. Hohe Konzentrationen an Cl^- scheinen nur in geringem Maß zur Stabilisierung der α-Helix des PTMLL beizutragen, wie aus den b_o-Werten der ORD-Spektren (Abb.20) hervorgeht. Der b_o-Wert des PTMLL in 2 molarer NaCl-Lösung betrug -80, das bedeutet 13 %-igen Helixanteil.

Die stabilisierende Wirkung der Anionen auf die α-Helix wird beim PTMLL-NaBr deutlicher, wie man in Abb. 20 sieht. Der b_o-Wert von PTMLL-NaBr nahm mit steigender Br^--Konzentration ab, und reichte in 2 molarer NaBr-Lösung bis zu -195 (31 %-iger Helixanteil).

5.2.3. in Tensid-Lösungen

Tenside wie Na-Dodecylsulfat, die mit einer langen aliphatischen Alkylgruppe verbundenen einwertig negativen Sulfationen, verursachen schon in sehr geringen Konzentrationen starke Denaturierung der Proteine. Die Wirkungen der Tenside auf die Konformation basischer Poly-α-Aminosäuren wurden auch ausführlich untersucht; alle PLL-Homologe $R = -(CH_2)_n-NH_2$, $n = 3,4,5,6,7$ bilden α-Helices mit Na-Dodecylsulfat (NDS) bzw. Na-Octylsulfat (NOS) auch im neutralen pH-Bereich, allerdings mit Ausnahme vom PLL- NDS, das eine β-Faltblattstruktur bildet (44,66,76,77,78). Aber diese β-Struktur von PLL-NDS unterscheidet sich durch eine kleinere Reste-Elliptizität des CD-Spektrums von der β-Struktur, die aus PLL bei pH 11 durch Erhitzen erhalten wurde (76,79,80,81). Diese helixstabilisierende Wirkung der Tenside wurde in einigen Arbeiten auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückgeführt (46,66,78,82). Aber der Befund der helixstabilisierenden Effekte des NaMethylsulfates bei hoher Konzentration deutet darauf hin, daß es sich hierbei sehr wahrscheinlich um einen elektrostatischen Abschirmeffekt der $R-SO_4^-$-Gruppe handelt (4). Diese elektrostatische Wechselwirkungen beim Komplex aus basischen Poly-α-Aminosäuren und Tensiden wurden auch in der Arbeit von MATTICE und HARRISON nachgewiesen,wobei die Effekte der Tenside auf in geladenen Zustand der basischen Poly-α-Aminosäuren aufgetreten waren (83). Außerdem wirkten Tenside nur in geringem Maß auf Poly-L-glutaminsäure mit geladenen Seitenketten (84).



Kurve:

1) PTMLL in H_2O
2) PTMLL ($4.9 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) in NOS-Lösung (1.0 Mol/l)
3) PTMLL ($4.9 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) in NDS-Lösung($5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l)
4) PLL ($1.2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) in NDS-Lösung($2.6 \cdot 10^{-2}$ Mol/l)
5) PLL ($6.2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) in NOS-Lösung(0.7 Mol/l)

4),5) stammen aus der Arbeit von SATAKE und YANG (66)

Abb. 22. CD-Spektren des PTMLL in Tensid-Lösungen c = 0.01 %, bei 22°C, Küvettendicke 1 cm

In Abb. 22 werden CD-Spektren des PTMLL in Tensid-Lösungen gezeigt. Im Gegensatz zu PLL wurde PTMLL von Tensiden nur in geringem Maß beeinflußt, wie aus den CD-Spektren hervorgeht. Die Reste-Elliptizität am Maximum bei 217 nm $[\theta]_{217}$ des PTMLL ($4.9 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) in NDS-Lösung ($5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) (Kurve3) betrug +2570 Deg·cm²/deciMol, es zeigt sich also eine mäßige Abnahme gegenüber +5590 in Wasser, aber diese Änderung ist noch geringer als im Falle vom PLL, da PLL bei der selben NDS - Konzentration schon in die β-Faltblattstruktur übergeht (Kurve 5). In Abb. 23 werden die gegensätzliche Effekte des NDS auf PLL und PTMLL noch anschaulicher gezeigt, wobei $[\theta]_{217}$-Werte gegen den Logarithmus der NDS-Konzentration

aufgetragen wurden. Die Werte von PLL-NDS wurden aus der Arbeit von SATAKE und YANG (66) entnommen. Oberhalb $5.0 \cdot 10^{-4}$ molarer NDS-Konzentration, daß heißt, wenn das Mol-Verhältnis NDS /PTMLL größer als eins wurde, fiel der Komplex aus, demfolge waren die CD-Spektren auch bei Verwendung kürzerer Küvetten nicht mehr reproduzierbar. Solche Unlöslichkeit trat auch bei PLL-NDS auf, jedoch wurde dieser Komplex oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration(CMC, 0.008 Mol für NDS) aufgelöst (66). Dagegen wurde der ausgefallenene Komplex von PTMLL- NDS auch bei höheren NDS-Konzentrationen nicht wieder aufgelöst.

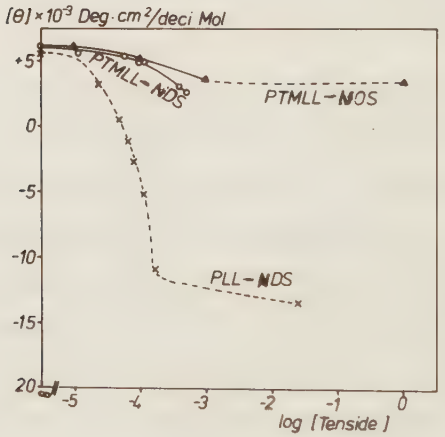


Abb. 23. Abhängigkeit der $[\theta]_{217}$-Werte des PTMLL und PLL vom Logarithmus der Tensid-Konzentration
(x) PLL ($4.95 \cdot 10^{-4}$Mol/l) in NDS
aus der Arbeit von SATAKE und YANG (66)
(o) PTMLL ($4.9 \cdot 10^{-4}$Mol/l) in NDS
(Δ) PTMLL ($4.9 \cdot 10^{-4}$Mol/l) in NOS

Diese geringen Effekte von Tensiden auf die Struktur des PTMLL gilt auch für NOS, wie das CD-Spektrum (Kurve 2 in Abb.22) zeigt. Mit PTMLL ($4.9 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) in $1.0 \cdot 10^{-3}$molarer NOS-Lösung erhält man ein ähnliches CD-Spektrum wie PTMLL in NDS ($5 \cdot 10^{-4}$Mol/l)-Lösung. Die Reste-Elliptizität am Maximum $[\theta]_{217}$ betrug +3550 Deg·cm^2/deciMol. Oberhalb $5 \cdot 10^{-3}$molarer NOS -Konzentration bildete PTMLL-NOS auch einen Niederschlag, der jedoch in 1.0 molarer NOS-Lösung wieder aufgelöst wurde. $[\theta]_{217}$ des PTMLL in 1.0 molarer NOS -Lösung betrug +3460, also ungefähr gleich wie in 10^{-3}molarer NOS-Lösung. Die Abhängigkeit der $[\theta]_{217}$-Werte des PTMLL in NOS-Lösungen wurde auch in Abb. 23 von der NOS-Konzentration gezeigt.

Im völligen Gegensatz zu PLL-Homologen wurde PTMLL von Tensiden wie NDS und NOS nur in geringem Maß beeinflußt. Diese geringen Effekte der Tenside auf PTMLL sind vergleichbar mit denen der Sulfat- bzw. Methylsulfationen. Dies deutet darauf hin, daß die Tenside wie auch Sulfat- bzw. Methylsulfationen auf gleicher Weise die Struktur des PTMLL beeinflussen.
Wir deuten diese Ergebnisse so, daß die Wirkungen der Tenside auf basische Poly-α-Aminosäuren primär nicht durch hydrophobe Wechselwirkungen, sondern durch elektrostatische Wechselwirkungen zustandekommen.

5.2.4. in alkoholischen Lösungen

Bekanntlich wird die α-Helix der Poly-α-Aminosäuren in organischen Lösungen wie z.B. in Alkoholen stark stabilisiert; So bildet das PLL in neutralem pH-Bereich eine stabile α-Helix in > 88 %-igen Methanol-Lösungen (44,85) bzw. in > 76 %-igen iso-Propanol-Lösungen (85). Diese α-Helix-Stabilisierung des PLL und anderer Poly-α-Aminosäuren durch Alkohole wurde in den Arbeiten (44,69,85,86) darauf zurückgeführt, daß durch die Abnahme der Wasseraktivität der pK-Wert der NH_2-Gruppe an den Seitenketten abnimmt und damit intrachenare Wasserstoffbrückenbindungen verstärkt werden bzw., daß der zugegebene Alkohol mit den geordneten Wassermolekülen in der Salvatationszone um die Polyionen der Poly-α-Aminosäuren konkurriert und schließlich von einem bestimmten Alkohol-Gehalt ab die Wassermoleküle aus der Solvatationszone nahezu völlig verdrängen, wodurch die Poly-α-Aminosäure trotz der noch vorhandenen Ladungen der Seitenketten in die α-Helix übergeht(93). In der Arbeit von EBERT (4) wurde PLL in organischen Lösungsmitteln verschiedener Dielektrizitätskonstanten (DK) untersucht. Dabei wurde gezeigt, daß die Stabilität der α-Helix basischer Poly-α-Aminosäuren durch die DK-bedingte Entropieänderung in hohem Maß beeinflußt wird; in organischen Systemen werden sich die Ladungen der Seitenketten mit abnehmender DK stärker abstoßen, damit werden die Freiheitsgrade der Kette und damit die Entropie des Systems abnehmen. Hierbei handelt sich um eine indirekte Stabilisierung.

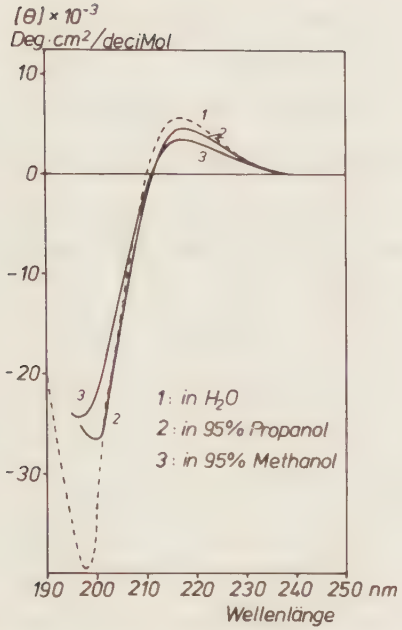


Abb. 24.
CD-Spektren des PTMLL in alkoholischen Lösungen c=0.05 %, bei 22°C, Küvettendicke 0.1 cm

PTMLL ist vollständig löslich sowohl in 95 %-igem Methanol als auch in 95 %-igem Propanol. CD-Spektren des PTMLL in alkoholischen Lösungen wurden in Abb. 24 gezeigt. Im Gegensatz zu PLL bildete PTMLL keine α-Helix in 95 %-igem Methanol, wie aus der Kurve 3 hervorgeht, allerdings nahm die Reste-Elliptizität bei 217 nm $[\theta]_{217}$ von +5520 Deg·cm^2/deciMol in Wasser auf +3510 ab.

In 95 %-igem n- und iso-Propanol deutet das CD-Spektrum (Kurve 2) auf noch kleinere Änderungen der Struktur des PTMLL hin, wobei $[\theta]_{217}$-Wert +4520 betrug. Daß die Konformation des PTMLL in Gegensatz zu der des PLL nur in geringem Maß von Alkoholen beeinflußt wird, deutet auch darauf hin, daß die Abstoßung zwischen den ε-$N(CH_3)_3^+$-Gruppen des PTMLL durch Wechselwirkungen mit den Alkoholen sicherlich nicht unterdrückt, sondern mit der Abnahme der DK in alkoholischen Systemen noch verstärkt, da die abstoßende Kraft umgekehrt proportional

der DK des Medium ist. Die DK des Wassers beträgt 79.6, die des Methanols 33.2, die des n-Propanol 20.5 und die des i-Propanol 18.7 (alle bei 22°C). Die kleinere DK des Propanols erklärt, warum Propanol einen kleineren Effekt auf die Struktur des PTMLL hat, wie aus der Abb. 24 hervorgeht, da die Zunahme der elektrostatischen Abstoßung in Propanol sicher größer als die in Methanol ist.

6. Zusammenfassung

Die Einführung von N^{ε}-Methylgruppen in Poly-L-lysin (PLL) wurde auf zwei unterschiedlichen Wegen erreicht;
1) Durch Reaktion mit 2-Acetaminoacrylsäureester, wobei das gebildete Lysinoalanin (LAL) durch anschließend N^{ε}-Methylierung unter β-Eliminierung gespalten wird. 2) Durch direkte N^{ε}-Methylierung. Die maximale Ausbeute an LAL wird bei pH 9.5 und 30°C mit etwa 60 % erhalten. Der Methylierungsgrad der Lysine sowohl bei der LAL-Spaltung als auch bei der direkten Methylierung ist abhängig vom pH-Wert der Reaktion. Oberhalb etwa pH 10 wurde das bisdahin dominierende N^{ε}-Dimethyllysin weiter zum N^{ε}-Trimethyllysin umgesetzt. Nach diesen Ergebnissen wurde Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysin (PTMLL) durch direkte Methylierung des PLL (M.G. 118000) mit CH_3J bei pH 10 und 30°C hergestellt.(M.G. von PTMLL = 165000). Bei der Methylierung der LAL-Reste wird auch die noch unbekannte Aminosäure, das N^{ε}-Methyl-N^{ε}-(2-Amino-2-carboxyäthyl)-lysin (N^{ε}-Methyllysinoalanin) erhalten und durch die Synthese aus N^{ε}-Methyllysin und 2-Acetaminoacrylsäureester identifiziert.

PTMLL in Wasser zeigt aufgrund des CD-Spektrums eine Konformation wie PLL in saurer Lösung, die von TIFFANY und KRIMM für die gestreckte Helix gehalten wurde. Im gegensatz zum PLL fand beim PTMLL erwartungsgemäß keine pH-induzierte Ordnungsumwandlung statt, da die Möglichkeit der Deprotonierung durch die Einführung der ε-$N(CH_3)_3^+$-Gruppen an Stelle der ε-NH_3^+-Gruppen genommen wurde.

Bereits durch geringe Konzentrationen an ClO_4^- wird jedoch die α-Helix des PTMLL stabilisiert. Dies kann auf eine Adsorption der ClO_4^--Ionen an den Seitenketten zurückgeführt werden, wodurch eine Abschirmung der sich gegenseitig stark abstoßenden ε-$N(CH_3)_3^+$-Gruppen bewirkt wird. Dies ist offenbar viel effektiver als bei der PLL-ClO_4^--Helix. Anscheinend ist dies dadurch bedingt, daß ε-$N(CH_3)_3^+$-Ionen einen stärker strukturbrechenden Charakter gegenüber der Wasserstruktur als die ε-NH_3^+-Ionen haben, wie aus deren unterschiedlichen elektronischen Strukturen erwartet wird. Die thermische Stabilität der α-Helix von PTMLL-ClO_4 nimmt mit der ClO_4^--Konzentration zu — Der T_m-Wert wird mit steigender ClO_4^--Konzentration erhöht. Untersuchungen der α-Helix stabilisierenden Wirkung anderer Anionen ergab, daß SCN^--Ionen auch in hohem Maß stabilisierend auf die α-Helix des PTMLL wirken. J^--Ionen tragen mäßig zur Helixstabilisierung des PTMLL bei, Br^--Ionen noch weniger und Cl^--Ionen am geringsten. Zusammenfassend sind die Helixstabilisierungseffekte der Anionen auf PTMLL durch folgende Reihe gegeben; $ClO_4^- > SCN^- \gg J^- > Br^- > Cl^-$. Diese Reihe entspricht etwa dem strukturbrechenden Charakter der Ionen auf die Wasserstruktur. Dies bedeutet offenbar, daß die Änderung der Wasserstruktur bei der Wechselwirkungen zwischen Polypeptiden und Anionen eine entscheidende Rolle spielt. SO_4^{2-}-Ionen wirken nicht stabilisierend auf die α-Helix des PTMLL. Aus den CD-Spektren scheint zu folgen, daß die Konformation des PTMLL durch SO_4^{2-} weniger beeinflußt wird als die des PLL. Während $CH_3SO_4^-$-Ionen bei hoher Konzentration die Helix des PLL stabilisieren, rufen sie keine Helixstabilisierung bei PTMLL hervor.

Im Gegensatz zum PLL wirken Tenside wie NDS und NOS nur in geringerem Maße auf PTMLL und deren Effekte sind vergleibar mit denen von $CH_3SO_4^-$-Ionen. Daher kann man annehmen, daß die stabilisierenden Wirkungen der Tenside auf die hier untersuchten basischen Poly-α-Aminosäuren sehr wahrscheinlich primär durch elektrostatische Wechselwirkungen zustandekommen, nicht durch hydrophobe Wechselwirkungen.
Alkohole tragen im Gegensatz zum PLL nicht zur Stabilisierung der α-Helix des PTMLL bei. Propanol zeigt dabei einen geringeren Effekt als Methanol, wofür die kleinere Dielektrizitätskonstante des Propanol und damit die stärker zugenommene elektrostatische Abstoßung zwischen den ε-$N(CH_3)_3^+$-Gruppen verantwortlich sein dürfte.

7. Experimenteller Teil

7.1. Trocknung der verwendeten Lösungsmittel

THF wurde über KOH vordestilliert, und danach mit Kalium versetzt und unter Rückfluß gekocht. In N_2-Atmosphäre wurde das getrocknete THF abdestilliert (Kp=66°C).
Feuchtigkeitsindikator ; Benzophenon

n-HEPTAN(chem. rein) wurde destilliert (Kp=98°C) und über einem Molekularsieb mit 4 Å Porengröße(Fa. Merck) aufbewahrt. Da es in größeren Mengen gebraucht wurde, ist es aus den NCA-Mutterlaugen (s.U.) nach Behandlung mit konz. Kalilauge durch fraktionierte Destillation zurückgewonnen worden.

THF und HEPTAN wurden in besonderen, mit einem Teflon- und einem Schwanzhahn ausgestatteten Vorratsflaschen aufbewahrt, aus denen der Inhalt mit trockenem Stickstoff gedrückt werden konnte. Die Flaschen für THF hatten Lichtschutzfärbung.

DIOXAN wurde wie THF behandelt, Kp=101°C. Bei Verwendung als Polymerisationsmedium wurde das so behandelte Dioxan immer frisch eingesetzt.

DMF wurde im Vakuum destilliert und unter Stickstoff in einer Flasche aufbewahrt, die auch Lichtschutzfärbung hatte.

METHANOL wurde mit $Mg(OCH_3)_2$ versetzt und abdestilliert. $Mg(OCH_3)_2$ wurde dadurch erhalten, daß trockene Mg-Späne (5g) mit einer kleinen Menge von Jodid (0.5g) in Methanol (50 ml) erwärmt wurden, bis alle Mg-Späne in Lösung gegangen war. Anschließend wurde Methanol (ca. 1l) zugegeben und unter

Rückfluß gekocht (1 St.), dann abdestilliert.

BENZOL wurde, um Thiophen zu entfernen, mit konz. H_2SO_4 wiederholt geschüttelt, bis keine rote Farbe in der Schwefelsäurephase mehr auftrat. Das so behandelte Benzol wurde mit Wasser und mit 10 %-iger Na_2CO_3-Lösung gewaschen und dann über $CaCl_2$ getrocknet. Vorgetrockenes Benzol wurde weiter über Na-Draht vollständig getrocknet und abdestilliert.

CHLOROFORM wurde wie Benzol mit konz. H_2SO_4 behandelt, um den als Stabilisator verwendeten Alkohol zu entfernen. Das über $CaCl_2$ getrocknete Chloroform wurde frisch abdestilliert.

HEXAN (chem. rein) wurde direkt verwendet.

Schutzgaskolben und Fritten sowie alle andern Glasgeräte, die bei der NCA-Darstellung und der Polymerisation gebraucht wurden, wurden bei 200°C und einem Druck 1 Torr zwei Stunden im Trockenofen ausgeheizt.

7.2. Methodik

7.2.1. Druchführung des Aminosäureanalysen

Alle Aminosäureanalysen wurden mit einem Gerät der Fa. Biocal BC 200 mit automatischen Probenaufgeber BC 501 durchgeführt. Zur gesonderten Bestimmung der basischen Aminosäuren wurden Analysen an einer Säule mit dem Harz Bio Rad A5 durchgeführt. Die einzelnen Aminosäuren wurden durch Vergleich mit einer Testanalyse quantitativ ausgewertet.

a) Verfahren Nr. 1

Um eine gute Auftrennung der basischen Aminosäuren, insbesondere der N^{ϵ}-methylierten Lysine zu erreichen, wurde das Analyseverfahren von PAIK und KIM (12) abgewandelt. Die Füllhöhe der Säule betrug 29 cm, die Pufferdurchflußgeschwindigkeit 60 ml/St. und die Ninhydrinflußgeschwindigkeit 30 ml/St.. Es wurde folgendes Programm verwendet;

Zeit	Puffer	Temperatur	Ninhydrin
300 min.	0.35N Na^{+}-konz. pH5.83	30°C	"
360 "	"	"	-

Bei diesem Programm war es nicht erforderlich, die Säule nach jeder Analyse zu regenerieren. Nach jeweils zehn Analysen wurde eine Regenerierung mit 0.4 N NaOH durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurde Lysinoalanin (LAL,91 Min.) sehr gut vom Lysin (121 Min.) getrennt, und auch gelang es N^{ϵ}-Methyllysin (MML) von den übrigen mehrfach methylierten Lysinen zu isolieren. Allerdings was es nicht möglich mit dieser Methode N^{ϵ}-Dimethyllysin (DML) und N^{ϵ}-Trimethyllysin(TML) zu trennen, die hinter dem MML(135 Min.) in einem Peak auftraten. Ein Gemisch von synthetisch dargestelltem DML und TML ergab ebenfalls nur einem Peak, der bei 144 Min. erschien.

b) Verfahren Nr. 2

Um eine bessere Auftrennung der N^{ϵ}-methylierten Lysine zu erreichen, wurde das Analyseverfahren von LANGE und HEMPEL (14) abgewandelt, indem die Höhe der Säule auf 51 cm erhöht und der pH-Wert der Natriumcitratpuffer auf 6.92 geändert wurde.

Die Apparatur wurde folgendermaßen programmiert;

Zeit	Puffer	Temperatur	Ninhydrin
300 Min.	0.35N Na^+-konz. pH 6.92	30°C	"
360 "	"	"	-

Eine Regenerierung der Säule mit 0.4N NaOH war bei diesem Programm ebenfalls nicht erforderlich und wurde jeweils nur nach zehn Analysen durchgeführt. Es gelang mit diesem Verfahren DML und TML vollständig zu trennen. Neben dem Peak von LAL(99 Min.), Lys (190 Min.) und MML (220 Min.) wurden DML (238 Min.) und TML (257 Min.) durch den Vergleich mit den synthetisch dargestellten Substanzen nachgewiesen.

C) Reagentien für die Aminosäureanalysen

Puffer:
Bei den verwendeten Puffern handelt es sich stets um Natrium-citratpuffer. Die o.a. Normalität beziehen sich auf die Konzentration an Na^+-Ionen. Weiterhin wurde pro Liter 0.1 ml einer 5 %-igen alkoholischen Pentachlorophenol-Lösung und 0.1 ml Caprylsäure (p.A. von Fluka) zugesetzt. Für eine gute Auftrennung der Aminosäuren ist es notwendig, den pH-Wert der Puffer genau einzustellen. Die erlaubten Abweichungen der pH-Werte betragen 0.01 Einheiten. Die Messung der pH-Werte wurde mit einem pH-Meter der Fa. Radiometer (Typ PM 25) und mit einer kombinierten Glaselektrode (Typ GK 2321C) durchgeführt.

Ninhydrinreagenz:
3l Ninhydrinreagenz setzen sich aus 2250 ml Äthylenglykolmonomethyläther (Methyl Cellosolve, p.A. der Fa. Merck), 750 ml 4N Natriumacetatpuffer (pH 5.51), 60g Ninhydrin p.A. (Fa. Merck)

und 1200 mg $SnCl_2 \cdot H_2O$ zusammen. Die Ninhydrinlösung wurde in einer lichtundurchlässigen Flasche unter Stickstoff aufbewahrt. Diese Lösung war ca. 8 Wochen verwendungsfähig.

d) Herstellung der Analysenproben

Die genau abgemessene Proben (ca. 0.01 mM Polypeptide) wurde von der Reaktionslösung genommen, und in einem Reagenzglas mit 10 ml 6N HCl versetzt. Die Proben wurde in einer Eis-Kochsalz-Mischung abgekühlt, und daraufhin mit N_2 durchgespült und abgeschmolzen. Anschließend wurde sie 12 St. bei 105°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde danach am Rotavapor zur Trockene eingedampft und dreimal mit bidest. Wasser aufgenommen und erneut eingedampft, um die Salzsäure vollständig zu entfernen. Der Rückstand wurde mit einem Natriumacetat-Puffer (pH 2.2) aufgenommen, verdünnt und nach der Filtration zur Analyse am Aminosäureanalysator eingesetzt.

7.2.2. Viskosimetrische Messungen

Zur Molekulargewichtsbestimmung der untersuchten Polymeren wurde ein automatisches Viskosimeter "Viscomatic" der Fa. Sofica (Le Mensil St. Denis) mit einer Mikrobürette der Fa. Metrohm (Herisau) benutzt. Der Viskosimeter (Fa. Normag) wurde von einem Thermostat der Fa. Lauda, Typ K4RD mit der Genauigkeit von ±0.1°C temperiert. Die Kapillare hatte die Länge von 100 mm und den Durchmesser von 0.55 mm. Die Durchflußzeit für reines DMF betrug ca. 140 Sek. und für Wasser ca. 160 Sek., deshalb wurde auf eine HAGENBACH-COUETTE-Korrektur verzichtet. Der durch ein P_2O_5 Trockenrohr gegen Feuchtigkeit geschützte

Viskosimeter-Innenraum konnte magnetisch gerührt werden. Die Ganauigkeit der Duchflußzeitmessung betrug ±0.01 sek..
An den Poly-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysin-Lösungen in DMF (c=0.7 x 10^{-3} ~ 22 x 10^{-3} g/ml) wird der Staudinger-Index$[\eta]$ üblicherweise durch Auftragen der $\eta sp/c$ -Werte gegen c bzw. gegen ηsp erhalten, und aus Gl. $[\eta] = 2.24 \times 10^{-7} \times M^{1.26}$ (87) das Molekulargewicht des PCBL ausgewertet. An den Poly-L-lysin- und Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysin-Lösung in Wasser (c=1 %) wurde ηsp (c=1 %) bei 25°C gemessen, und mit Gl. (88) $\log DP = 0.79 \log \eta sp$ (c=1 %) + 2.46 das Molekulargewicht ausgerechnet.

7.2.3. CD- und ORD-Messungen

CD- und ORD-Spektren wurden mit dem "Jasco-20 Automatic Recording Spectropolarimeter"(Fa. Japan Spec. Co.) aufgenommen. Die Küvetten aus geschmolzenen Quarz (Fa. Hellma) der Dicke 0.1-1 cm für CD und 1-5 cm für ORD wurden von einem Thermostat (Fa. Lauda) mit einer Genauigkeit von ±0.05°C temperiert. Alle CD- und ORD-Messung wurden unter starkem Stickstoffstrom durchgeführt. Die Proben des PLL und PTMLL wurden jeweils aus 0.2 %- oder1.0 %-igen wässrigen Vorratslösungen durch Verdünnen mit Salzlösungen bzw. Alkoholen hergestellt. Die Konzentration der Polypeptide wurde mit Hilfe des Aminosäureanalysators (s. Exp. 7.2.1.) bestimmt. Für die CD-Messungen wurden 0.01-0.05 %-ige Polypeptid-Lösungen eingesetzt, aber die Konzentrationen der ORD-Proben betrug 0.1 %. Alle eingesetzten Reagentien bei den optischen Messungen waren p.A.-bzw. Suprapur-Qualität der Fa. Merck.

Die pH-Werte der Proben wurden mit einem pH-Meter der Fa. Radiometer (Typ PM 25) und mit einer kombinierten Glaselektrode (Typ GK 2321C) gemessen.
Bei der CD-Untersuchung vom PTMLL-ClO_4^--Komplex ($[ClO_4^-] > 3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l) wurden die vorher temperierten trüben Lösungen mit einer Zentrifuge der Fa. Beckmann (Model J-21) mit der Geschwindigkeit von 18000 U/Min. 15 Minuten zentrifugiert, um die Niederschläge abzutrennen. Die überstehenden klaren Lösungen wurden abgetrennt und die Niederschläge wurden wieder in den entsprechenden $NaClO_4$-Lösungen suspendiert.

Bei der CD-Messungen wurden die Reste-Elliptizitäten $[\theta]_\lambda$ aus den vom Gerät abgelesenen Elliptizitäten θ_λ bei der Wellenlänge λ von 300 nm bis zu 185 nm nach folgender Definition berechnet.

$$[\theta]_\lambda = \frac{M}{c'd} \cdot \theta_\lambda = \frac{10}{cd} \cdot \theta_\lambda$$

$[\theta]_\lambda$: Reste-Elliptizität, Deg·cm^2/deciMol
θ_λ : gemessene Elliptizität bei der Wellenlänge λ
c′ : Konzentration der Polypeptide, g/100 ml
c : Konzentration der Polypeptide, Mol Peptid-Reste/l
d : die Dicke der Küvette, dm
M : Rest-Gewicht der Polypeptide

Bei der Untersuchung der im UV-Bereich stark absorbierenden Anionen wurden ORD-Spektren von 700 nm bis zu 280 nm aufgenommen. Spezifische Drehungen bzw. Reste-Drehungen wurden definitionsgemäß nach folgenden Gleichungen ausgerechnet;

$$[\alpha]_\lambda = \frac{100}{c'd} \cdot \alpha_\lambda$$

$$[m]_\lambda = \frac{M}{100} \cdot [\alpha]_\lambda = \frac{M}{c'd} \cdot [\alpha]_\lambda = \frac{10}{cd} \cdot \alpha_\lambda$$

α_λ : gemessene optische Drehung bei Wellenlänge λ

$[\alpha]_\lambda$: Spezifische Drehung

$[m]_\lambda$: Reste-Drehung

c' : Konzentration der Polypeptide, g/100 ml

c : Konzentration der Polypeptide, Mol Peptid Reste/l

d : Küvettendicke, dm

M : Rest-Gewicht der Polypeptide

Da die optischen Rotationstärke vom Brechungsindex des Mediums abhängig sind, müssen die optischen Drehungen mit Hilfe des LORENTZ Faktors $\frac{3}{n^2+2}$ auf die Werten im Vakuum reduziert werden, damit die Werten in verschiedenen optischen Medien miteinander verglichen werden können.

$$[m']_\lambda = \frac{3}{n^2+2} \cdot [m]_\lambda = \frac{3}{n^2+2} \cdot \frac{M}{100} \cdot [\alpha]_\lambda$$

$[m']_\lambda$: recuzierte Reste-Drehung

n : der Brechungsindex des Mediums bei Wellenlänge λ

n-Werte der untersuchten Lösungen wurden den Tabellen (89) entnommen und mittels der SELLME ERśchen Näherung, $n^2 = 1 + \frac{a\lambda^2}{\lambda^2 - \lambda_p^2}$ umgerechnet. Um die Effekte der Anionen auf die Konformation des PTMLL zu bestimmen, wurde die MOFFIT-YANG Gl. (74,75) verwendet;

$$[m']_\lambda = [m]_\lambda \cdot \frac{3}{n^2+2} = \frac{a_o\lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} + \frac{b_o\lambda_o^4}{(\lambda^2 - \lambda_o^2)^2}$$

λ_o = 212 nm, a_o und b_o sind Konstante

Der MOFFIT-YANG-Parameter, b_o wurde durch den Auftrag von $[m']_\lambda(\lambda^2-\lambda_o^2)$ gegen $\lambda^2-\lambda_o^2$ erhalten. Bekanntlich ist b_o eine Funktion der helicalen Hauptketten der Polypeptide, und unabhängig von Seitenketten und Umgebungen. Für die vollständige α-Helix beträgt b_o im allgemeinen -630, dagegen für ungeordnete Strukturen 0.

7.2.4. IR-, UV- und NMR-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit dem Perkin-Elmer Gitter IR-Spektralphotometer 457 aufgenommen. Die Proben waren pulverisiert und als KBr-Tabletten gepreßt. Die UV-Spektren wurden mit einem Gerät von Fa. Carl Zeiss (Typ DMR 21) aufgenommen. Die Konzentration der PLL-Lösungen in Wasser war 0.1 %. Die NMR-Spektren wurden mit dem Gerät von Fa. Varian (Typ T 60) aufgenommen.

7.3. Untersuchung der Lysinoalaninbildung an Poly-L-lysin mit Hilfe des pH-Staten

Für die Versuche der LAL-Bildung und der folgenden LAL-Spaltung durch Methylierung wurde ein pH-Stat der Fa. Radiometer verwendet. Es bestand aus einem pH-Meter (Typ 26), Titrator (Typ 11) und einer automatischen Mikrobürette (Typ ABU-12). Das pH-Meter wurde mit einer Kalomelelektrode K401 und einer Glaselektrode G202 ausgerüstet. In die Mikrobürette (Inhalt 2.5 ml) wurde 0.1 N NaOH eingefüllt. Die von einem Thermostat temperierte doppelmantelige Meßzelle (Inhalt ca. 20 ml) wurde mit einem elektrischen bzw. magnetischen Rührer stark gerührt.

Für einen Versuch wurden 16.9 mg (0.1 mM) PLL·HCl in 10 ml H_2O versetzt und auf dem gewünschten pH-Wert eingestellt. Dazu wurde 15.7 mg (0.11 mM) N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester (2-Acetaminoacrylsäuremethylester) zugegeben und bei einer bestimmten Temperatur 8 St. umgesetzt. Nach der Reaktion wurde ein Teil der Reaktionslösung entnommen und zur Aminosäureanalyse eingesetzt. Die Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt;

bei 20°C ; bei pH 6,7,8,9,10,11 und 12

bei pH 9.5 ; bei 20°,30°,35°,40° und 50°C

Außerdem wurden 0.1 mM PLL-HCl bei 30°C und pH 9.5 jeweils mit 0.11, 0.20 und 0.30 mM N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester umgesetzt.

7.4. Untersuchung der Lysinoalaninspaltung an Copoly-L-Lys-LAL durch Methylierung

Copoly-L-Lys-LAL wurde durch die unter 7.3. beschriebene Methode erhalten; 168.7 mg (1.0 mM) PLL·HCl wurden bei 30°C und pH 9.5 mit 156.3 mg (2.0 mM) N^{α}-Acetyldehydroalaninmethylester umgesetzt. Durch Aminosäureanalyse wurde ermittelt, daß 50-60 % der gesamten Lysinreste zu LAL-resten umgesetzt wurden. Die so erhaltene Copoly-L-Lys-LAL-Lösung wurde auf 100 ml verdünnt, und weiter zur LAL-Spaltung durch Methylierung eingesetzt. Für einen Versuch wurden 10 ml Copoly-L-Lys-LAL-Lösung (0.1 mM gesamte Polypeptide) mit 2 ml CH_3J ebenfalls mit Hilfe des pH-Staten umgesetzt. Die Reaktionen wurden bei den konstanten Temperaturen und pH-Werten 8 St. durchgeführt. Nach der Reaktion wurden die entstandenen Lysinderivate durch

Aminosäureanalyse bestimmt. Die Reaktionsbedingungen waren folgende;

bei 30°C ; pH 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 10, 11 und 12

bei 20°C ; pH 6, 7, 8, 9, 10 und 11

bei 40°C ; pH 6, 7, 8, 9, 10 und 11

7.5. Untersuchung der direkten Methylierung an Poly-L-lysin

16.9 mg (0.1 mM) PLL·HCl wurden jeweils bei den gleichen Bedingungen wie 7.4. mit 2 ml CH_3J umgesetzt.

7.6. Herstellung des Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysins durch Methylierung von Poly-L-lysin

674.6 mg (4.0 mM) PLL·HCl in 10 ml H_2O wurden in eine Meßzelle des pH-Staten eingefüllt, und bei pH 10 und 25°C mit überschüssigem CH_3J umgesetzt. Nach 8 St. wurden über 98 % der gesamten ε-NH_2-Gruppen trimethyliert, wie die Aminosäureanalyse zeigte. Nach der Reaktion wurde die Lösung mit verdünnter HCl-Lösung auf pH 3 eingestellt, und 1 Woche gegen 0.01 N HCl, anschließend 3 Tage gegen Wasser dialysiert. Nach dem Filtrieren wurde sie gefriergetrocknet, wobei Poly-N^{ε}-trimethyl-L-lysin als schwach gelblicher Schaum erhalten wurde. Anschließend wurde das Polymere im Vakuum bei 40°C vollständig von Wasser befreit.

Ausbeute : 74.5 % d.Th.

Durch Viskosinetrie (s. Exp. 7.2.2.) wurde ηsp (c=1 %) in Wasser bei 25°C 3.535 bestimmt, und ein Molekulargewicht von 165000 ermittelt.

7.7. Darstellung des Poly-L-lysins

7.7.1. N^{ε}-Carbobenzoxy-L-lysin (18)

100 g Lysin-Monohydrochlorid wurden in 1000 ml Wasser gelöst und mit 150 g basischem $CuCO_3$ eine Stunde unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde heiß filtriert und das überschüssige $CuCO_3$ mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wurde auf $0^{\circ}C$ abgekühlt und unter Rühren mit 100 ml Chlorameisensäurebenzylester und 417 ml 2.78 N NaOH tropfenweise über einen Zeitraum von 90 Min. versetzt. Der ausgefallene Cu-Komplex von N^{ε}-Carbobenzoxylysin wurde abgesaugt, mit Wasser und Aceton gewaschen und in 1200 ml 2N HCl aufgenommen. Bei $40^{\circ}C$ wurde über mehrere Stunden H_2S eingeleitet, das CuS anschließend abgesaugt und die Mutterlauge eingeengt. Mit konz. Ammoniak auf pH 7 eingestellt, fiel über Nacht im Kühlschrank N^{ε}-Carbobenzoxylysin kristallin aus. Aus dem 20 %-methanolhaltigen Wasser umkristallisiert ergab es eine Ausbeute von 118 g d. i. 85 % d. Th.

Fp = $245-250^{\circ}C$

7.7.2. N^{ε}-Carbobenzoxy-L-lysin-N^{α}-carboxyanhydrid

In das Reaktiongefäß der in Abb. 25. gezeigten Apparatur wurde 30 g sehr fein gemahlenes und über P_2O_5 getrocknetes N^{ε}-Carbobenzoxy-L-lysin eingefüllt und mit 400 ml absolutem THF versetzt. In die weiße Suspension wurde unter Rühren trockenes Phosgen (Fa. MesserGriesheim) eingeleitet und auf $35^{\circ}C$ Reaktionstemperatur erwärmt. Das Phosgen wurde zur

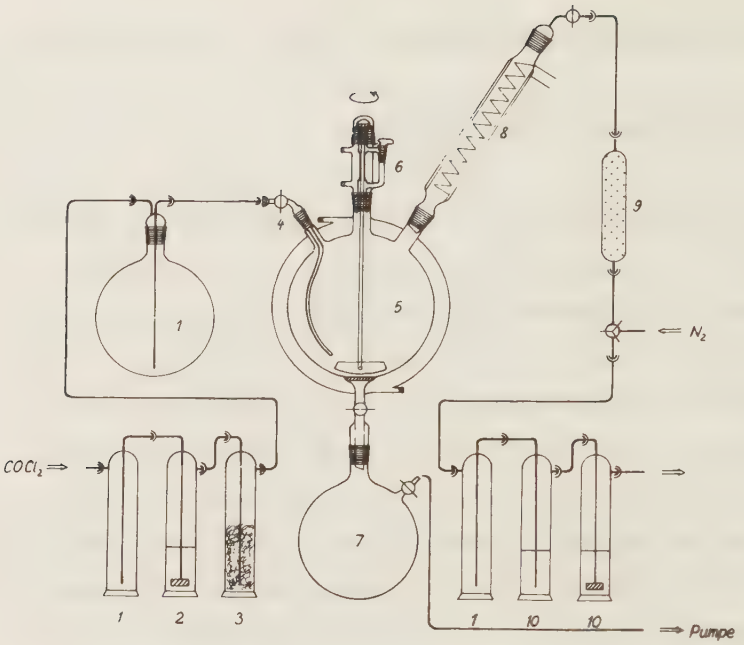


Abb. 25. Appatatur zur Darstellung der N^{ε}-Carbobenzoxy-L-lysin-N^{α}-carboxyanhydrid
1) Sicherheitsgefäß 2) Waschflasche (konz. H_2SO_4)
3) Aerosolrückhaltegefäß mit Glaswolle
4) Gaseinleitungsrohr 5) temperierbarer Reaktionskolben 6) Vakuumrührer (KPG) 7) Auffangkolben
8) Intensivkühler 9) Trockenrohr (P_2O_5)
10) Waschflasche (20 % NaOH)

Trocknung durch konz. Schwefelsäure, danach zur Abscheidung ebentuell mitgerissener Schwefelsäuretröpfen durch Glaswolle geleitet. Überschüssiges Phosgen bzw. entstandener Chlorwasserstoff wurde am Ausgang der Apparatur in einer 20 %-igen Kalilauge vernichtet. Nach ca. 40 Min. ist die Reaktion beendet, indem die weiße Suspension in eine homogene klare Lösung übergegangen ist. Dann wurde trockener Stickstoff ca. 1 St. eingeleitet, um überschüssig gebliebenes Phosgen zu entfernen. Die erhaltene klare oder schwach gelbliche NCA-Lösung wurde

durch die eingeschmolzene Glasfritte in den Auffangkolben abgesaugt und am Rotavapor (Bad-Temperatur 35°C) bis zur Trockene eingeengt. Zur nahezu restlosen Entfernung von Phosgen und HCL wurde das NCA noch dreimal in THF gelöst und eingeengt. Sowohl bei dieser Reinigung als auch bei späterer Umkristallisation muß man unter trockenem Stickstoff arbeiten. Schließlich wurde das NCA durch Zugabe von überschüssigem n-Heptan gefällt. und bei unter -10°C bewahrt. Nach weiterum dreimaligen Umkristallisieren aus THF/n-Heptan wurde reines NCA erhalten.
Ausbeute : 76.4 % d.Th.
Fp = 96.8°C u. Zs. (Lit. : 95-100°C)

Das so gereinigte NCA war bei -20°C ohne jede Zersetzungserscheinung mindestens ein halbes Jahr lagerfähig. Vor der Polymerisation wurde das abfiltrierte NCA mit n-Heptan gewaschen und zunächst im Stickstoffstrom, und anschließend im Vakuum getrocknet.

7.7.3. Natriummethylat-Initiator (90,91)

3 g des unter Petroläther geschnittenen Natriums wurden zuerst in Methanol kurz gewaschen und dann 125 ml absolutem Methanol in N_2-atmosphäre versetzt. Nach der Beendigung der Reaktion wurde 375 ml absolutes Benzol zugegeben. Die Lösung war bei Zimmertemperatur klar. Die erhaltene Natriummethylat-Lösung wurde mit Benzoesäure standardisiert (92), wobei die eingewogene Benzoesäure in Methanol/Benzol (1 : 3) in Gegenwert von Phenolphthalein-Indikator mit Natriummethylat-Lösung titriert wurde. Die Benzoesäure wurde auf 140°C erhitzt, die geschmolzene Substanz wieder abgekühlt, gemahlen und getrocknet.

Die Konzentration der $NaOCH_3$-Lösung war 0.208 N. Die Lösung wurde unter Ausschuß von CO_2 und Feuchtigkeit bewahrt.

7.7.4. Poly-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysin (26)

24 g getrocknetes N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysin-N^{α}-carboxyanhydrid wurden in 240 ml frisch abdestilliertem Dioxan gelöst. Unter Rühren wurde 0.48 ml Natriummethylat-Lösung ([A]/[I] = 200) in die Lösung zugegeben. Die Polymerisation wurde einen Tag durchgeführt, und entstandenes CO_2 wurde durch den geöffneten, aber mit einem P_2O_5-Trockenrohr geschützen Hahn entlassen. Die erhaltene zähe Polymerisatlösung wurde direkt weiter zur Abspaltung der Schutzgruppe umgesetzt. Um das Molekulargewicht zu bestimmen, wurde ein Teil der Polymerisatlösung entnommen und in einen 10-fachen Überschuß an Äthanol (95 %) zugegeben, wobei das Polymere als klebiges Material ausfiel. Das abgetrennte Polymere wurde wieder in $CHCl_3$ aufgelöst und mit einem 10-fachen Überschuß an n-Hexan als lange Stränge gefällt. Das erhaltene PCBL wurde abgesaugt, mit n-Hexan ausgewaschen und bei 40°C im Vakuum getrocknet.
Ausbeute : 80.2 % d.Th.
Der Staudinger-Index wurde in DMF bei 20°C mit $[\eta]$=146.2 ml/g ermittelt (s. Exp. 7.2.2.). Hiernach beträgt das Molekulargewicht 256000.

7.7.5. Poly-L-lysin (26)

Die PCBL-Polymerisatlösung in Dioxan wurde nach der Polymerisation direkt zur Abspaltung der Schutzgruppe eingesetzt. Um das Ausfallen der Polymeren während der Reaktion zu verhindern,

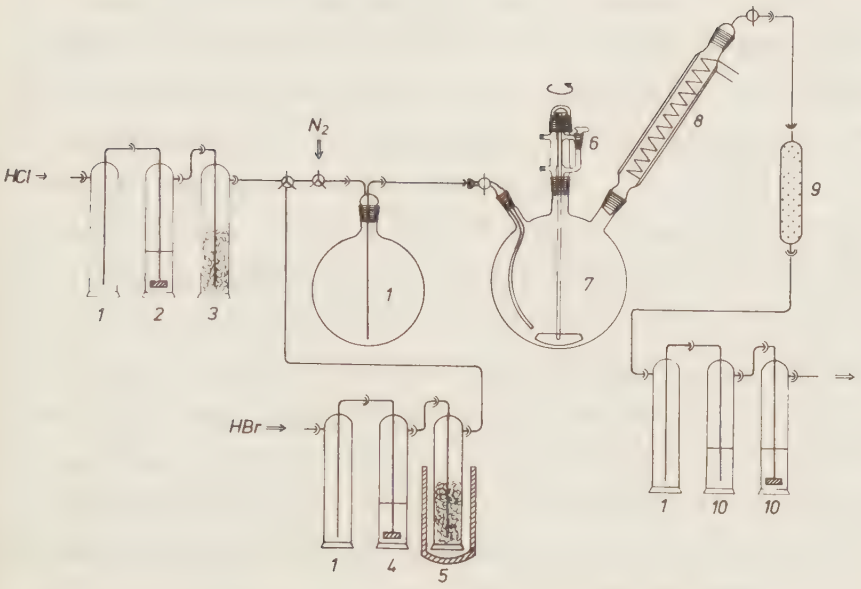


Abb. 26. Apparatur zur Abspaltung der Carbobenzoxy-Schutzgruppen
1) Sicherheitsgefäß 2) Waschflasche (konz. H_2SO_4)
3) Aerosolrückhaltegefäß mit Glaswolle
4) Waschflasche (Tetralin) 5) Kühlfalle (Trockeneis in Aceton) 6) Vakuumrührer 7) Reaktionskolben
8) Intensivkühler 9) Trockenrohr (P_2O_5)
10) Waschflasche (20 % KOH)

wurde sie erstens mit ca. dem zweifachen Volumen trockenes $CHCl_3$ verdünnt. Die Apparatur ist in Abb. 26 gezeigt. Das HCl-Gas (Fa. MesserGriesheim) wurde zur Trocknung durch konz. Schwefelsäure, danach zur Abscheidung eventuell mitgerissener Schwefelsäuretröpfen durch Glaswolle geleitet. Das HBr-Gas (Fa. Messer Griesheim) wurde zur Abscheidung von freiem Brom durch Tetralin, danach zur Abscheidung der Wasser- und Tetralintröpfen durch eine Kühlfalle (Trockeneis in Aceton) geleitet. Überschüssiges Gas wurde am Ausgang der Apparatur in 20 %-iger Kalilauge

vernichtet. Trockenes HCl-Gas wurde unter Rühren 3 St., und dann trockenes HBr-Gas 4 St. in die Lösung eingeleitet, wobei abgespaltenes PLL ausfiel. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde die Lösung ohne weitere Gaseinleitung mehrere Stunden weiter gerührt. Danach wurde trockener Stickstoff eingeleitet, um übriggebliebenes Gas auszutreiben. Der abgetrennte Niederschlag wurde in 100 ml Na_2CO_3-Lösung (gesätt.) aufgenommen und mit Äther extrahiert, um org. Nebenprodukte abzutrennen. Die abgetrennte wässrige Phase wurde mit verdünnter HCl-Lösung auf pH 3 eingestellt, filtriert, und eine Woche gegen 0.01 N HCl-Lösung, dann 3 Tage gegen bidest. Wasser dialysiert, wobei dialysierende HCl-Lös. bzw. Wasser mehrmals ausgewechselt wurde. Die dialysierte PLL-Lösung wurde nochmals filtriert, anschließend mit einem Gerät der Fa. Leybold-Heraus (Typ GT2) gefriergetrocknet. Erhaltenes PLL wurde bei 40°C unter Vakuum vollständig getrocknet.

Ausbeute : 68 % d. Th.

Erhaltenes PLL·HCl zeigte keine Absorption bei 260-250 mμ, was bedeutet, daß alle Carbobenzoxygruppen vollständig abgespalten wurden (43). Bei der Viskosimetrischen Messung (s. Exp. 7.2.2.) betrug ηsp (c=1 %) in Wasser bei 25°C 3.056, das deutet ein Molekulargewicht von 118000.

7.8. Darstellung des N^{α}-Acetaminodehydroalaninmethylesters (2-Acetaminoacrylsäuremethylester) (33)

1.3 g 2-Acetaminoacrylsäure (Merck-Schuchardt) wurden in 50 ml Wasser mit äquimolarer Menge von NaOH versetzt, bis alle in Lösung gegangen war. Dazu wurde ein Überschüß an konz. $AgNO_3$-Lösung gegeben und die Lösung im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach einigen Stunden war das Silbersalz der 2-Acetaminoacrylsäure auskristallisiert. Es wurde abfiltriert und mit wenig Wasser gewaschen. Unreagierte 2-Acetaminoacrylsäure konnte durch Ansäuren des Filtrats mit H_2SO_4 zurückgewonnen werden. Das erhaltene Silbersalz der 2-Acetaminoacrylsäure wurde mit 30 ml getrocknetem Petroläther versetzt und mit einem Überschuß an CH_3J unter Zusatz einer geringen Menge Hydrochinon eine Stunde unter Rückfluß gekocht. Das AgJ wurde abfiltriert und mit Petroläther nachgewaschen. Das Filtrat wurde eingeengt und die auskristallisierten Nadeln des Methylesters zweimal aus Petroläther (40-60°C) umkristallisiert.
Ausbeute : 0.73 g (65 % d. Th.), Fp = 52-54°C
Der Ester konnte bei -18°C einige Wochen aufgewahrt werden.

7.9. Lysinoalanin, N^{ε}-(2-Amino-2-carboxyäthyl)-L-lysin (31)

a) N^{ε}-Carbobenzoxy-N^{α}-acetyllysin (18)

16.5 g N^{ε}-Carbobenzoxylysin wurden in 75 ml 1 N NaOH gelöst und auf 0°C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden unter weiterer Kühlung portionsweise 11.25 ml Acetanhydrid und 150 ml 1 N NaOH langsam zugetropft und eine Stunde bei Zimmertemperatur weitergerührt. Anschließend wurde die Lösung mit wenig HCl neutralisiert und mit Äther extrahiert. Die wässrige Lösung wurde mit HCl versetzt, wobei sich das N^{ε}-Carbobenzoxy-N^{α}-acetyllysin als Öl absetzte. Es wurde mit Äthylacetat mehrer Male extrahiert. Die Äthylacetatphase wurde mit verdünnter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen und anschließend mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abziehen des Äthylacetats im Vakuum bei 40°C wurde ein gelbes Öl erhalten, das direkt zur Hydrierung eingesetzt wurde.

Das aus Äthanol-Wasser umkristallisierte Produkt ergab einen Schmelzpunkt (Fp) von 107-110°C.

b) N^{α}-Acetyllysin

Das aus a) erhaltene Öl wurde in 100 ml Äthanol aufgenommen, 5 ml Essigsäure zugefügt und mit 3 g Palladium-Aktivkohle-Katalysator für 20 St. zur Hydrierung in Autoklaven bei Zimmertemperatur und einem Druck von 15 atm. H_2 eingesetzt. Bei Beginn der katalytischen Hydrierung wurde dreimal nach jeweils zwei Stunden der Druck am Autoklaven abgelassen und Wasserstoff neu aufgegeben, um das entstandene CO_2 zu entfernen. Der Katalysator wurde am Ende der Hydrierung abfiltriert und mit Äthanol und Wasser gut gewaschen. Beim Einengen des Filtrats fiel das N -Acetyllysin direkt aus.
Aus Wasser-Äthanol wurde es umkristallisiert.
Ausbeute : 7.7 g (66 % d.Th.)
Zersetzungspunkt : 245-248°C

c) N^{ε}-(2-Acetamino-2-methoxycarbonyläthyl)-N^{α}-acetyllysin (31)

0.56 g N^{α}-Acetyllysin wurden in 5 ml 0.06 N NaOH gelöst und bei 0-10°C 0.45 g 2-Acetaminoacrylsäuremethylester zugefügt. Nach beendeter Zugabe wurde noch 10 Stunden bei Zimmertemperatur weitergerührt. Die Lösung wurde anschließend mit Amberlite IRP-64 (H-Form) behandelt und das Eluat bei 40°C im Vakuum unter wiederholter Zugabe von Äthanol zur Trockene gebracht, wobei ein Schaum entstand. Nach Umkristallisieren aus Äthanol-Äther wurden 0.8 g N^{ε}-(2-Acetamino-2-methoxycarbonyläthyl)-N^{α}-acetyllysin erhalten. Das Rohprodukt wurde weiter zur

Hydrolyse eingesetzt.
Ausbeute : 80 % d.Th.

d) N^{ε}-(2-Amino-2-carboxyäthyl)-L-lysin, Lysinoalanin

1 g erhaltenes N^{ε}-(2-Acetamino-2-methoxycarbonyläthyl)-N^{α}-acetyllysin wurden mit 25 ml 6N HCl unter Rückfluß 5 Stunden gekocht. Dann wurde das Hydrolysat in Vakuum eingeengt und durch mehrmalige Abziehung die überschüssige Salzsäure entfernt, wobei ein Schaum zurückblieb, der wieder in Wasser gelöst und mit Aktivkohle behandelt wurde. Nach dem Einengenen auf ein kleines Volumen kristallisierte das N^{ε}-(2-Amino-2-carboxyäthyl)-L-lysin-dihydrochlorid, Lysinoalanindihydrochlorid, beim Reiben nach Zusatz von Äthanol. Das Rohprodukt wurde aus wenig Wasser ung Äthanol umkristallisiert.
Ausbeute : 0.53 g (60 % d.Th.)
Fp = 176-178°C

7.10. N^{ε}-Dimethyllysin (35)

a) N^{ε}-Dimethyl-N^{α}-Acetyllysin

2.82 g N^{α}-Acetyllysin wurden in 50 ml Wasser gelöst und mit 10 ml 35 %-iger Formaldehydlösung und 3 g Palladium-Aktivkohle-Katalysator 17 Stunden im Autoklaven bei Zimmertemperatur und 15 atm. Wasserstoff zur Hydrierung eingesetzt. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wurde am Rotavapor mit Äthanol wiederholt zur Trockene eingedampft und der Rückstand aus Äthanol-Äther und zuletzt aus Äthanol umkristallisiert.
Ausbeute : 1.9 g (58 % d.Th.), Fp = 197-198°C

b) N^{ε}-Dimethyllysin dihydrochlorid

1 g N^{ε}-Demiethyllysin-N^{α}-acetyllysin wurden mit 50 ml 6N HCl zur Hydrolyse 4 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde die Lösung mit Wasser am Rotavapor mehrmals zur Trockene eingedampt und der Rückstand zweimal aus Äthanol-Aceton umkristallisiert. Das Produkt ist sehr hygroskopisch.

Ausbeute : 0.62 g (53 % d.Th.), Fp = 171-172°C

7.11. N^{ε}-Trimethyllysin (36)

1 g N^{α}-Acetyllysin wurden mit 20 ml Wasser, 9.0 g $Ba(OH)_2$ und 6 ml Dimethylsulfat 36 Stunden bei Zimmertemperatur umgesetzt. Anschließend wurde mit konz. HCl neutralisiert und die Lösung auf einen HCl-Gehalt von ca. 20 % gebracht. Nach dem Abfiltrieren des $BaSO_4$ wurde zur Hydrolyse 10 Stunden unter Rückfluß gekocht, die restliche Schwefelsäure mit $Ba(OH)_2$ gefällt und das Filtrat am Rotavapor mit Wasser mehrmals zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde mit Äthanol aufgenommen, nochmals am Rotavapor eingedampft und dreimals aus Aceton-Äther umkristallisiert. Das erhaltene N^{ε}-Trimethyllysin·HCl ist sehr hygroskopisch und bei 40°C unter Vakuum getrocknet worden.

Ausbeute : 0.91 g (57 % d.Th.), Fp = 260°C

7.12. Synthese von N^{ε}-Methyl-N^{ε}-(2-Amino-2-carboxyäthyl)-L-lysin (N^{ε}-Methyllysinoalanin)

0.49 g (2.5 mMol) N^{ε}-Methyl-L-lysin·HCl (Fa. Serva) und 0.44 g (2.5 mMol) DL-Alanin (Fa.Merck) wurden in 10 ml o.1 molarer Natriumborat-Lösung gelöst. Dieser Lösung wurden 0.55 g (2.5 mMol) basisches CuO_3 zugefügt und unter Rückfluß 30 Miniten gekocht, auf 25°C abgekühlt und filtriert. Zum Filtrat wurden 10 ml Äthanol und 0.445 g (5mMol) 2-Acetaminoacrylsäuremethylester gegeben. Die homogene blaue Lösung wurde im geschlossenen Kolben bei 50°C für 24 Stunden erwärmt. Nach dem Einengen am Rotavapor wurden der Rückstand in 10 ml H_2O aufgenommen. In die Lösung wurde H_2S 5 Stunden eingeleitet. Anschließend wurde die Lösung mit Aktivkohle behandelt und filtriert. In das erhaltene farblose Filtrat wurden 10 ml 12 N HCl gegeben und unter Rückfluß 2 St. gekocht. Anschließend wurde die Lösung wiederholt mit Wasser aufgenommen und am Rotavapor eingeengt. Das erhaltene Öl wurde in 8 ml H_2O aufgenommen und über eine Säule mit dem Harz Dowex 50-x8 (200-400 Mesh, 1.0 x 40 cm) gegeben. Die Säule wurde zuerst mit 2l H_2O, 1l 1N HCl und 0.5l 2N HCl gewaschen. Dann wurde das N^{ε}-Methyllysinoalanin mit 2l 4N HCl eluiert. Nach dem Einengen am Rotavapor wurden der Rückstand wiederholt in Wasser aufgenommen und verdampft, um vollständig HCl zu entfernen. Das erhaltene Öl wurde in 10 ml H_2O aufgenommen und mit Aktivkohle behandelt und anschließend filtriert. Dazu wurden 10 ml einer 1 molaren Lösung von Pyridin in Äthanol zugegeben und mit 240 ml Äthanol verdünnt. Die Lösung wurde bei -20°C 48 St. aufbewahrt. Das gesammelte Rohprodukt

wurde in H_2O/Äthanol umkristallisiert und über P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Das Produkt ist hygroskopisch.

Ausbeute : 0.42 g (52 % d.Th.), Fp = 165-167°C

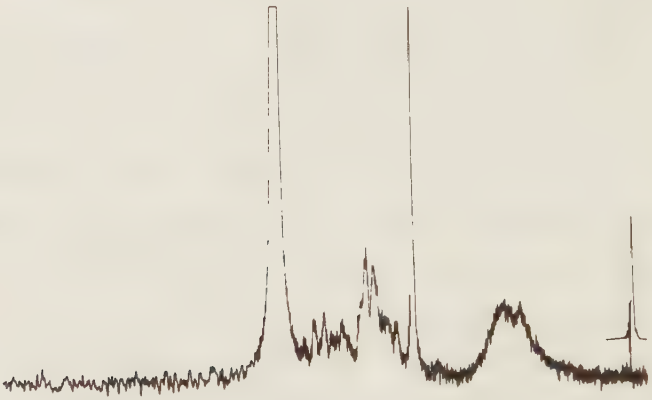


Abb. 27. Das NMR-Spektrum des N^{ε}-Methyl-N^{ε}-(2-amino-2-carboxyäthyl)-L-lysins
^1H (D_2O) : 1.53 (m,6H), 2.87 (s,3H), 3.70 (m,4H), 4.06 (m,2H)

8. Literaturverzeichnis

1. E.R.BLOUT, C.de LOZÉ, S.M.BLOOM und G.D.FASMAN, J.Am.Chem.Soc. 82, 3787 (1960)
   E.R.BLOUT; in "Polyaminoacids, Polypeptides and Proteins" (Herausg. M.A.STAHMAN), S.275(Wisconsin 1962)
   G.D.FASMAN; in "Poly-α-Aminoacids" S.504(New York 1967)

2. Ch.EBERT, G.EBERT und W.WERNER, Kolloid Z. und Z. Polymere 251, 504 (1973)

3. Ch.EBERT und G.EBERT, Progr. Colloid and Polymere Sci.57, 100 (1975)

4. Ch.EBERT und G.EBERT, Colloid and Polymer Sci. 255, 1041 (1977)

5. Z.BOHAK, J.Biol.Chem. 239, 2878 (1964)
   A.PATCHORNICK und M.SOKOLOVSKY, J.Am.Chem.Soc. 86, 1860(1964)
   M.STERNBERG und C.Y.KIM; in "Protein Crosslinking, Adv. in Exp.Med. and Biol." Vol. 86B (Herausg. M.FRIEDMAN), S.74 (New York 1977)

6. M.STERNBERG und C.Y.KIM, Science 190, 992 (1975)

7. E.CROSS et al., ACS 166th Natl.Mtg.Abstract$^{\#}$81 (Chicago 1973); in "Protein Crosslinking" Vol. 86B,S.131

8. P.A.FINOT, E.BUJARD und M.ARNAUD; in "Protein Crosslinking" Vol. 86B,S.51

9. D.H.GOULD und J.T.MacGREGOR; in "Protein Crosslinking" Vol. 86B,S.29

10a. Ch.EBERT, Appl.Polymer Symp. No.18, 221 (1971)

10b. Ch.EBERT, Dissertation (Marburg. 1971); in "Protein Crosslinking" Vol.86B,S.197

11. R.B.AMBLER und M.W.REES, Nature 184, 56 (1959)
K.MURRAY, Biochemistry 3, 10 (1964)

12. W.K.PAIK und S.KIM. Biochem. et Biophys.Res.Comm. 27, 479 (1967)

13. K.HEMPEL, H.W.LANGE und L.BIRKOFER, Naturwiss. 55, 37 (1968): Hopp-Seylerś Z.Physiol.Chem. 350, 966 (1969)

14. H.W.LANGE und K.HEMPEL, J.Chromat. 107, 389 (1975)

15. G.EBERT, Ch.EBERT und L.PAUDJOJO, Prog. in Colloid Sci. (im Druck)

16. E.SCHRÖDER und K.LÜBKE; in "The peptides" Vol.I, S.3-51 (New York 1965)

17. M.BERGMANN und L.ZERVAS, B. 65, 1192 (1932)

18. A.NEUBERGER und F.SANGER, Biochem.J. 37, 515 (1943)

19. H.LEUCHS, B. 39, 857 (1906)

20. F.FUCHS, B.55, 2943 (1922)

21. A.C.FARTHING, J.Chem.Soc. 1950, 3213

22. E.KATCHALSKI und M.SELA; in "Adv. in Protein Chem." (Heraus.C.B.ANFINSEN,Jr.et al.) Vol. 13, S. 248 (New York 1958)

23. C.H.BAMFORD und H.BLOCK; in "Polyaminoacids, Polypeptides and Proteins" (Heraus.M.A.STAHMAN) S.65 (Wisconsin 1962)

24. D.G.H.BALLARD und C.H.BAMFORD, J.Chem.Soc. 1956, 381

25. D.G.H.BALLARD, C.H.BAMFORD und F.J.WEYMOUTH, Nature 174, 173 (1954)

26. G.D.FASMAN, M.IDELSON und E.R.BLOUT, J.Am.Chem.Soc. 83, 709 (1961)

27. E.KATCHALSKI et al., J.Am.Chem.Soc. 70, 2094 (1948)

28. R.H.SIFFERD und V.du VIGNEUD, J.Biol.Chem. 108, 753 (1935)

29. D.BEN-ISHAI und A.BERGER, J.Org.Chem. 17, 1564 (1952)

30. M.FRIEDMAN und J.S.WALL, J.Am.Chem.Soc. 86, 3735 (1964)
M.FRIEDMAN, J.F.CAVINS und J.S.WALL, J.Am.Chem.Soc. 87, 3672 (1965)
M.FRIEDMAN, J.Am.Chem.Soc. 89, 4709 (1967)

31. T.OKUDA und H.ZAHN, B. 98, 1164 (1965)

32. M.FRIEDMAN, J.W.FINLEY und L.S.YEH; in "Protein-crosslinking" Vol. 86B,S.213

33. E.ROTHSTEIN, J.Chem.Soc. 1949, 1968

34. R.E.BOWMAN, J.Chem.Soc. 1950, 1346

35. L.BENOITON, Can.J.Chem. 42, 2043 (1964)

36. R.ENGER und F.HALLE, Hoppe-Seylerś Z.Physiol.Chem. 191, 103 (1930)

37. J.W.FINLEY und J.T.SNOW, J.argic.Food Chem. 25, 1421 (1977)

38. A.J.ADLER, N.J.GREENFIELD und G.D.FASMAN; in "Methods in Enzymology" (Heraus.C.H.W.Hirs und S.N.TIMASHEFF) Vol. 27 Part D, S.675 (New York 1973)

39. S.KUBOTA, unveröff., beschrieb. in Ref. 44

40. M.HATANO und M.YONEYAMA, J.Am.Chem.Soc. 92, 1392 (1970)

41. S.R.CHAUDHURI und J.T.YANG, Biochemistry 7, 1379 (1968)

42. G.HOLZWORTH und P.DOTY, J.Am.Chem.Soc. 87, 218 (1965)

43. J.APPLEQUIST und P.DOTY; in "Polyaminoacids, Polypeptides and Proteins" (Heraus. M.A.STAHMAN) S.161 (Wisconsin 1962)

44. Y.W.TSENG und J.T.YANG,Biopolymers 16, 921 (1977)

45. H.YAMAMOTO und J.T.YANG, Biopolymers 13, 1109 (1974)

46. H.YAMAMOTO und J.T.YANG, Biopolymers 13, 1093 (1974)

47. H.YAMAMOTO und T.H.HAYAKAWA, Biopolymers 11, 1259 (1972)

48. N.MURAI und S.SUGAI, Biopolymers 13,1195 (1974)

49. N.ANAND, N.S.R.K.MURTHY, F.NAIDER und M.GOODMAN, Macronolecules 4, 564 (1971)

50. N.GREENFIELD und G.D.FASMAN, Biochemistry 8, 4108 (1969)

51. M.L.TIFFANY und S.KRIMM, Biopolymers 8, 347 (1969)

52. A.J.HOPFINGER; in "Conformational Properties of Macromolecules" S.172 (New York 1973)

53. D.G.DEARBORN und D.B.WETLAUFER, Biochem.Biophys.Res. Comm. 39, 314 (1970)

54. E.P.RAO und W.G.MILLER, Biopolymers 12, 835 (1973)

55. R.M.EPAND, G.E.WHEELER und M.A.MOSCARELLO, Biopolymers 13, 359 (1974)

56. W.L.MATTICE und W.H.HARRISON III, Biopolymers 14, 2025 (1975)

57. s. Ref. 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59
M.L.TIFFANY und S.KRIMM, Biopolymers 6, 1379 (1968)
M.L.TIFFANY und J.E.MARK, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 60, 1122 (1968)
W.B.RIPPON und A.G.WALTON, Biopolymers 10, 1207 (1971)
W.A.HILTNER, A.J.HOPFINGER und A.G.WALTON, J.Am.Chem. Soc. 94, 4324 (1972)
A.M.JAMIESON, L.MACK und A.G.WALTON, Biopolymers 11, 2267 (1972)
R.ZANA und C.TONDRE, J.Phys.Chem. 76, 1737 (1972)
D.BALASUBRAMANIAN, Biopolymers 13, 407 (1974)
P.C.PAINTER und J.L.KOENIG, Biopolymers 15, 229 (1976)

58. M.L.TIFFANY und S.KRIMM, Biopolymers 11, 2309 (1972)

59. A.W.NEUMANN, M.A.MOSCARELLO und R.M.EPAND, Biopolymers 12, 1945 (1973)

60. V.P.SAXENA und D.B.WETLAUFER, Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 68, 969 (1971)

61. Y.H.CHEN, J.T.YANG und H.M.MARTINEZ, Biochemistry 11, 4120 (1972)

62. J.Y.CASSIM und J.T.YANG, Biopolymers 9, 1475 (1970)

63. E.PEGGION, A.COSANI, M.TERBOJEVICH und G.BORIN, Biopolymers 11, 633 (1972)

64. B.H.ZIMM und J.K.BRAGG, J.Chem.Phys. 31, 526 (1959)

65. J.APPLEQUIST, J.Chem.Phys. 38, 934 (1963)

66. I.SATAKE und J.T.YANG, Biochem.Biophys.Res.Comm. 54, 930 (1973)

67. G.G.HAMMES und S.E SCHULLERY, Biochemistry 9, 2555 (1970)

68. G.G.HAMMES und S.E.SCHULLERY,Biochemistry 7, 3882 (1968)

69. N.BARTERI und B.PISPISA, Biopolymers 12, 2309 (1973)

70. J.Y.CASSIM und J.T.YANG, Biochem.Biophys.Res.Comm. 26, 58 (1967)

71. D.PUETT, A.CIFERRI, E.BIANCHI und J.HERMANS, Jr., J.Phys.Chem. 71, 4126 (1967)

72. A.CIFERRI, D.PUETT, L.RAJAGH und J.HERMANS, Jr., Biopolymers 6, 1019 (1968)

73. N.MURAI, M.MIYAZAKI und S.SUGAI, Nihon kagaku kaishi 659 (1976)

74. W.MOFFIT, J.Chem.Phys. 25, 467 (1956) : Proc.Natl. Acad.Sci.U.S. 42, 736 (1956)

75. W.MOFFIT und J.T.YANG, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 42, 596 (1956)

76. P.K.SARKAR und P.DOTY, Biochemistry 55, 981 (1966)

77. L-K.Li und A.SPECTOR, J.Am. Chem.Soc. 91, 220 (1969)

78. M.J.GROUKE und J.H.GIBBS, Biopolymers 5, 586 (1967)

79. K.ROSENHECK und P.DOTY, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 47, 1775 (1961)

80. R.TOWNEND,T.F.KUMOSINSKI und S.N.TIMASHEFF, Biochem.Biophys.Res.Comm. 23, 163 (1966)

81. B.DAVIDSON, N.TOONEY und G.D.FASMAN, Biochem.Biophys. Res.Comm. 23, 156 (1966)

82. I.SATAKE und J.T.YANG, Biopolymers 15,2263 (1976)

83. W.L.MATTICE und W.H.HARRISON,III, Biopolymers 15, 559 (1976)

84. G.D.FASMAN, C.LINDBLOW und E.BODENHEIMER, Biochemistry 3, 155 (1964)

85. R.M.EPAND und H.A.SCHERAGA, Biopolymers 6, 1383 (1968)

86. K.H.LIEM, D.POLAND und H.A.SCHERAGA, J.Am.Chem.Soc. 92, 5717 (1970)

87. E.DANIEL und E.KATCHALSKI; in "Polyaminoacids, Polypeptides and Proteins" (Herausg. M.A.STAHMAN) S.183 (Wisconsin 1962)

88. A.YARON und A. BERGER, Biochem.Biophys.Acta 69, 397 (1963)

89. von den Tabellen in G.D.FASMAN in "Methods in Enzymology" Vol. 6 (Herausg. S.P.COLOWICK und N.O. KAPLAN) S.928 (New York 1963); in "Landolt-Börnstein Phys.-Chem. Tabellen" 5-Auflage: in "Gmelins Handbuch der anorg. Chemie" 8-Auflage System Nr.21

Lebenslauf

Young-Ha K i m

geboren am 30.8.1946 in Seoul, KOREA

1952 - 1958	Susong-Volksschule in Seoul,KOREA
1958 - 1961	Kyunggi-Mittelschule in Seoul, KOREA
1961 - 1964	Kyunggi-Oberschule in Seoul, KOREA
1964 - 1971	Seoul National Universität in Seoul, KOREA (Bachelor of Science)
1967 - 1970	Militärdienst
1971 - 1973	Seoul National Universität in Seoul, KOREA (Master of Science)
1973 -	tätig in "Korea Institute of Science and Technology"
Oktober 1975	Beginn der Arbeit für die vorliegende Dissertation